

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica

Trabalho de Conclusão de Curso

*Estudo das Vias de Sinalização Envolvidas no
Pré-condicionamento com N-Metil-D-Aspartato (NMDA) sobre
Convulsões Induzidas por Ácido Quinolínico em Camundongos*

Acadêmico: Bruno Herculano

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carla Inês Tasca

Co-Orientador: M.Sc. Samuel Vandresen Filho

Florianópolis, novembro de 2008.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Francilene e Alexandre, e ao meu irmão Mateus, sem cujo amor e apoio nada disto teria sido possível.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Carla Inês Tasca, por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho, por ter me ensinado tudo o que sei (ou que acho que sei) nestes 3 anos de jornada, e por ter incutido em mim a curiosidade, determinação e perseverança indispensáveis à carreira científica.

Ao meu co-orientador, Samuel Vandresen-Filho, pelo companheirismo, apoio e colaboração tanto neste projeto como em projetos passados e futuros.

À Prof^a Thereza Christina Lima Nogueira, por ter me permitido utilizar o equipamento necessário para a realização deste projeto.

Aos meus amigos Wagner, Rodrigo, Luiz, Carla, Madoka, Haruna, Damian, Bianca, Mayumi e Lúcia, pelo apoio e compreensão quanto à minha “ausência” durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos Ricardo e Ronan que apesar da distância me apoiaram em todas as fases desta jornada.

Ao pessoal do laboratório, Tharine, Simone, Ellen, João, Suely, Ana e Tet, por todo o apoio e companheirismo e por garantir que nenhum dia de trabalho fosse igual ao outro.

Agradeço também a todos que de certa forma ajudaram, ou pelo menos não atrapalharam a realização deste trabalho.

Índice

Lista de Abreviaturas.....	5
Lista de Figuras.....	6
Resumo.....	7
Abstract.....	8
1. Introdução.....	10
1.1 Glutamato e Neurotransmissão.....	10
1.2 Excitotoxicidade.....	12
1.3 Ácido Quinolínico.....	12
1.4 Pré-condicionamento.....	13
1.5 Vias de Sinalização Intracelulares.....	15
1.5.1 Proteína Cinase C (PKC).....	15
1.5.2 Proteína Cinase Ativada por Mitógenos regulada por sinais extracelulares (MAPK/ERK).....	16
1.5.3 Proteína Cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina II (CaMKII).....	16
1.5.4 Proteína Cinase dependente de AMP cíclico (PKA).....	17
1.6 Justificativa.....	18
1.7 Objetivos.....	18
2 Materiais e Métodos.....	19

2.1 Animais.....	19
2.2 Procedimento Cirúrgico.....	19
2.3 Tratamento com Inibidores.....	20
2.4 Tratamento com NMDA.....	20
2.5 Convulsões com Ácido Quinolínico.....	20
2.6 Análise Estatística.....	21
3. Resultados.....	22
4. Discussão.....	30
4.1 Queleritrina e PKC.....	30
4.2 KN-62 e CaMKII.....	32
4.3 H-89 e PKA.....	33
4.4 PD98059 e ERK.....	34
5. Conclusões.....	37
6. Referências Bibliográficas.....	38
7. Anexos.....	50

Lista de Abreviaturas

AMP: Adenosina-5'-monofosfato

AMPA: Ácido α -Amino-3-Hidróxi-5-Metil-4-Isoxazolepropiónico

QA: Ácido Quinolínico

CaMKII: Proteína Cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina II

Ch: Queleritrina

CREB: Proteína de ligação ao elemento de resposta dependente de AMP cíclico

ERK: Proteína Cinase regulada por sinais extracelulares

H-89: N-[2-(*p*-Bromocinamilamino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida

i.c.v.: Intracerebroventricular

i.p.: Intraperitoneal

JNK: c-Jun N-terminal Cinase

KN-62: 1-[N,O-bis-(5-Isoquinolinesulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazina

LTP: Potenciação de Longa Duração

MAPK: Proteína Cinase Ativada por Mitógenos

MEK: MAPK/ERK Cinase

mGluR: Receptor Metabotrópico de Glutamato

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

PD98059: 2'-Amino-3'-metóxi flavona

PI3K: Fosfatidil-inositol-3 Cinase

PKA: Proteína Cinase dependente de AMP cíclico

PKC: Proteína Cinase C

SNC: Sistema Nervoso Central

SOD: Superóxido Dismutase

Lista de Figuras

Figura 1. Efeito da Inibição da Proteína Cinase C (PKC) por Queleritrina na proteção causada pelo pré-condicionamento com N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e nas convulsões induzidas por Ácido quinolínico.....	23
Figura 2. Efeito da Inibição da Proteína Cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina II (CaMKII) por KN-62 na proteção causada pelo pré-condicionamento com N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e nas convulsões induzidas por Ácido quinolínico.....	24
Figura 3. Efeito da Inibição da Proteína Cinase A (PKA) por H-89 na proteção causada pelo pré-condicionamento com N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e nas convulsões induzidas por Ácido quinolínico.....	25
Figura 4. Efeito da Inibição da ativação da Proteína Cinase Ativada por Mitógenos regulada por sinais extracelulares (MAPK/ERK) por PD98059 na proteção causada pelo pré-condicionamento com N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e nas convulsões induzidas por Ácido quinolínico.....	26
Figura 5. Mortalidade dos animais nos diferentes tratamentos.....	28
Figura 6. Latência e Duração das convulsões induzidas por Ácido Quinolínico nos diferentes tratamentos.....	29

Resumo

O pré-condicionamento cerebral se refere a um estado de tolerância transitória do tecido nervoso a um estímulo letal evocado por um insulto moderado prévio. O pré-condicionamento pode ser evocado por estímulos físicos ou químicos, como o pré-condicionamento com N-metil-D-aspartato (NMDA). O pré-condicionamento com NMDA pode ser promovido *in vivo* pela administração de uma dose sub-convulsivante de NMDA, com efeito neuroprotetor contra a toxicidade do cainato ou isquemia, além de prevenir convulsões e morte neuronal induzida pelo ácido quinolínico (QA) em camundongos. Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a participação das vias de sinalização intracelulares da Proteína Cinase C (PKC), da Proteína Cinase dependente de AMP cíclico (PKA), da Proteína Cinase regulada por sinais extracelulares (ERK), e da Proteína Cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina II (CaMKII) no fenômeno da neuroproteção atingida por meio de um pré-condicionamento químico. Os camundongos foram pré-condicionados com NMDA (75mg/kg, i.p) 24 h antes da infusão de AQ (4 μ l, 36,8nmol i.c.v.) e receberam inibidores específicos das vias de sinalização i.c.v 15 minutos antes do pré-condicionamento, ou 15 minutos antes da infusão de QA. A inibição da via de sinalização da PKA reverteu a proteção evocada por NMDA, e a inibição da via da ERK reverteu parcialmente esta proteção, reduzindo a taxa de proteção a 12,5%. O tratamento com os inibidores da PKC e da CaMKII não alteraram a taxa de proteção. A inibição da via de sinalização da PKC causou uma taxa de morte elevada quando da injeção de NMDA seguida da infusão de QA e quando seguida somente da infusão de QA. A inibição da via da ERK causou uma mortalidade elevada quando seguida da infusão de QA. A inibição das vias de sinalização não alterou a latência e duração das

convulsões causadas pelo QA. Os resultados aqui obtidos sugerem que as vias de sinalização da PKA e da ERK exerçam um papel crucial na obtenção de um estado neuroprotetor induzido pelo pré-condicionamento por NMDA.

Abstract

Brain preconditioning refers to a state of transient tolerance evoked by a brief insult in which the nervous tissue becomes more resistant to a lethal posterior insult. This preconditioning may be evoked by physical or chemical stimuli, such as the preconditioning by N-methyl-D-aspartate (NMDA). The preconditioning by NMDA may be promoted *in vivo* by the administration of a sub-convulsing NMDA dose, with a neuroprotective effect against kainate toxicity or ischemia, and it can prevent seizures and neuronal death induced by the infusion of Quinolinic Acid (QA) in mice. This study aims, as its primary objective, to evaluate the participation of the Protein Kinase C (PKC), cAMP-dependent Protein Kinase (PKA), Extracellular signal regulated Kinase (ERK), Ca²⁺/calmodulin II dependent Protein Kinase (CaMKII) signaling pathways in the neuroprotection phenomenon attained through chemical preconditioning. Adult Swiss Male mice were preconditioned with NMDA (75mg/kg, i.p) 24 h prior to the infusion of AQ (4 µl, 36,8nmol i.c.v.) and were treated with specific inhibitors of the aforementioned signaling pathways either 15 minutes before the preconditioning, or 15 minutes before the infusion of QA. The inhibition of the PKA pathway abolished the protection evoked by NMDA, and the inhibition of ERK pathway significantly diminished this protection, reducing the protection rate to 12.5%. Treatment with the PKC and CaMKII inhibitors did not alter the protection rate. The inhibition of the PKC

pathway resulted in a high mortality rate when carried out before NMDA preconditioning followed by QA infusion, and when carried out before the QA infusion. The inhibition of the ERK pathway resulted in a high mortality rate when followed by the infusion of QA. The inhibition of signaling pathways in this model did not alter the latency or duration of the QA-induced seizures. The results herein presented suggest that the PKA and ERK pathways have a crucial role in the achievement of a neuroprotective state induced by the NMDA preconditioning.

1 - Introdução

1.1 – Glutamato e Neurotransmissão

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos e está envolvido no desenvolvimento, sobrevivência neuronal, e em funções cerebrais vinculadas à aprendizagem e memória (Fonnum, 1984; Izquierdo, 1989; Meldrum, 2000), além de participar como mediador da comunicação intercelular, plasticidade, crescimento e diferenciação celular (Nedergaard et al., 2002; Aarts & Tymianski, 2003). Os efeitos do glutamato são mediados por receptores ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores metabotrópicos agem por intermédio da ativação da fosfolipase C ou por modulação da enzima adenilato ciclase (Obrenovitch & Urenjak, 1997). Evidências indicam que existem oito receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), subdivididos em três grupos de acordo a seletividade farmacológica, mecanismos de transdução do sinal e similaridade na sequência de aminoácidos. O grupo I de mGluR (mGlu1 e mGlu5) estimula a fosfolipase C, enquanto o grupo II (mGlu2 e mGlu3) e o grupo III (mGlu4, mGlu6, mGlu7 e mGlu8) modulam a atividade da adenilato ciclase (Gubellini et al, 2004; Swanson et al., 2005).

Farmacologicamente, os receptores ionotrópicos classificam-se em receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), de α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) e de cainato, de acordo com a maior seletividade por seus ligantes sintéticos específicos (Ahmadian et al., 2004). Fisiologicamente, os receptores AMPA e cainato estão relacionados à transmissão sináptica rápida no SNC e são caracterizados pelas rápidas cinéticas de ativação e desativação (Popescu & Auerbach, 2004), enquanto os receptores NMDA respondem mais lentamente ao glutamato e são considerados

responsáveis pelos processos de aprendizado e memória. Dentre os receptores glutamatérgicos, os receptores NMDA são os que possuem a maior afinidade pelo glutamato (Waxman et al., 2005). Os receptores NMDA são proteínas heteroméricas compostas da combinação de subunidades NR1 com as subunidades NR2A-D ou NR3A-B (Takagi et al., 2003). As subunidades NR1 são constitutivas e promovem a funcionalidade do receptor, enquanto que as subunidades NR2 e NR3 determinam a especificidade do receptor (Scott et al., 2003; Waxman et al., 2005). Acredita-se que duas subunidades NR1 se associem com duas subunidades NR2, de modo que a glicina, um co-agonista, una-se às subunidades NR1 e o glutamato às subunidades NR2 (Schorge et al., 2003).

Durante a transmissão sináptica, a ativação dos receptores NMDA requer a união simultânea de glicina e glutamato em combinação com despolarização da membrana celular (Waxman et al., 2005). No potencial de repouso, o canal do receptor é bloqueado pelo íon magnésio, o qual é expulso do canal após uma despolarização inicial. Com a abertura do canal do receptor NMDA, ocorre um influxo de íons sódio e principalmente de íons cálcio (Waxman et al., 2005). A ativação dos receptores NMDA produz uma corrente de ascensão e decaimento lentos que superam em duração aquelas geradas pela ativação dos receptores AMPA e kainato e deste modo acarreta em um potencial excitatório pós-sináptico mais prolongado (Gibb, 2004). A ativação dos receptores NMDA, deste modo, está associada a processos fisiológicos como o desenvolvimento, formação e plasticidade das sinapses, vinculados a fenômenos como a aprendizagem e a memória (Cull-Candy, et al., 2001).

1.2 – Excitotoxicidade

Excitotoxicidade é o processo no qual as células nervosas respondem inapropriadamente a concentrações elevadas de glutamato na fenda sináptica e que culmina com a morte celular (Lynch et al., 2002). Durante o processo de excitotoxicidade, ocorre uma ativação demasiada dos receptores glutamatérgicos na célula pós-sináptica, com conseqüente entrada de íons sódio e cálcio, o último, principalmente através dos receptores NMDA (Waring et al., 2005). O influxo excessivo de cálcio sobrecarrega os mecanismos reguladores como o sequestro de íons cálcio pelas mitocôndrias e pelo retículo endoplasmático que mantêm a sua concentração intracelular baixa, e promove, assim, uma ativação de diversos processos dependentes de cálcio, como o aumento da atividade de proteases, lipases, fosfatases e endonucleases que medeiam a morte celular (Arundine et al., 2003; Hynd et al., 2004) .

1.3 – Ácido Quinolínico

O ácido quinolínico (QA), um metabólito do aminoácido triptofano, através de sua metabolização pela via das quinureninas, foi inicialmente estabelecido como um intermediário na síntese do ácido nicotínico e da nicotinamida adenina dinucleotídeo (Stone et al., 2001). A sua importância no SNC só foi reconhecida quando Izyaslav Lapin (1978) observou que essa substância produzia excitação motora e/ou convulsões clônicas quando injetados no ventrículo lateral do cérebro de roedores. Atualmente, sabe-se que o QA causa convulsões através da ação sobre os receptores NMDA, particularmente, aqueles que contêm subunidades NR2B (Moroni et al., 1999; Schwarcz

et al., 2002). Dessa forma, a toxicidade promovida pelo QA envolve a ativação dos receptores NMDA, formação de radicais livres, peroxidação lipídica, carbonilação proteica e disfunção mitocondrial (Naredo et al., 2001).

A ativação de receptores NMDA pré-sinápticos pelo QA não altera a captação de glutamato pelos terminais sinápticos, mas aumenta a sua liberação na fenda sináptica (Tavares et al., 2002). Este efeito pode estar relacionado a um maior acúmulo de glutamato nas vesículas sinápticas, causado pela administração intracerebroventricular de QA (Tavares et al., 2008). Além disto, o QA causa a diminuição da captação de glutamato pelos astrócitos. Este processo resulta em uma concentração elevada deste aminoácido no meio extracelular, levando a uma estimulação exacerbada do sistema glutamatérgico e excitotoxicidade (Tavares et al., 2005).

1.4 – Pré-condicionamento

O pré-condicionamento é definido como a obtenção de um estado de proteção celular, tecidual ou do organismo como um todo através da exposição a insultos subletais que conferem, assim, certa tolerância a um insulto letal posterior (Dirnagl et al., 2003; Mergenthaler et al., 2004).

Estudos demonstraram que esse estado de tolerância cerebral pode ser obtido por diversos meios sejam estes químicos, elétricos ou anóxicos. A participação dos receptores NMDA na neuroproteção endógena foi demonstrada em diferentes modelos de pré-condicionamento pela abolição deste estado de tolerância quando da administração de antagonistas de receptores glutamatérgicos como a dizocilpina (MK-801) e a quetamina (Bond et al., 1999; Rejdak et al., 2001; Schaller et al., 2002;

Samoilov et al., 2003). A administração de uma dose subconvulsivante de NMDA via intraperitoneal tem sido utilizada como modelo de pré-condicionamento químico frente a diversos insultos letais posteriores (Boeck et al., 2004). Tais modelos têm demonstrado que este tratamento protege neurônios hipocâmpais de insulto isquêmico (Miao et al., 2005) e protege camundongos da convulsão induzida por QA, além da morte celular causada pelo mesmo (Boeck et al., 2004). Entretanto, o mecanismo exato pelo qual esse fenômeno ocorre ainda é desconhecido.

A ativação de receptores NMDA estimula a ativação da ecto-5'-nucleotidase, que por sua vez degrada a adenosina-5'-monofosfato (AMP) a adenosina, um importante neuromodulador endógeno, aumentando os níveis intracelulares desta. A união de adenosina a seus receptores A1 inibe a excitabilidade neuronal, reduz o influxo de Ca^{2+} e inibe a liberação de aminoácidos excitatórios como glutamato e aspartato, contribuindo assim para a obtenção de um estado neuroprotetor (Boeck et al., 2007).

Estudos realizados por Puisieux et al. (2004), por sua vez, demonstraram que o estado de neuroproteção não provém do aumento da atividade da enzima Superóxido-dismutase (SOD), e estudos posteriores realizados por Vandresen-Filho et al. (2007) evidenciaram que este estado de neuroproteção não é diretamente dependente da regulação do mecanismo antioxidante da glutatona. No entanto, estes estudos não descartam a possibilidade de que um breve estresse oxidativo causado pelo pré-condicionamento isquêmico ou a administração de NMDA possam levar à ativação de vias de sinalização que culminem em um estado de neuroproteção endógeno.

1.5 – Vias de Sinalização Intracelulares

1.5.1 – Proteína Cinase C (PKC)

A via de sinalização da Proteína Cinase C (PKC) está envolvida em diversos processos de vital importância no remodelamento sináptico, síntese protéica e reparo neuronal, bem como em outros processos importantes para a construção e consolidação da memória. (Nelson et al., 2008). Existem ao menos 10 isoformas da PKC, e estas podem ser divididas em 3 grupos de acordo com sua estrutura primária: Clássicas ($\alpha, \beta I, \beta II, \gamma$), Novas ($\delta, \epsilon, \eta, \theta$) e Atípicas ($\zeta, \iota/\lambda$). Após sua ativação e fosforilação, as PKCs podem atuar em conjunto com sinalizadores celulares secundários, translocam-se na membrana e fosforilam diversas outras proteínas intracelulares. O alvo das PKCs ativadas depende da isoforma da PKC em questão, o tecido e a localização desta na célula. Duas isoformas da PKC, PKC γ e PKC ϵ , são expressas em grande quantidade no cérebro, e estudos mostram o seu importante papel na proteção contra a isquemia e na resposta ao estresse no tecido nervoso (Chou et al., 2005; Barnett et al., 2007). Estas isoformas da PKC migram para a membrana durante e após um insulto isquêmico, passando a modular ativamente a neurotransmissão e a sobrevivência celular (Matsumoto et al., 2004). Estudos ainda apontam o seu papel fundamental no pré-condicionamento por NMDA, uma vez que a inibição específica da isoforma PKC ϵ anula completamente o efeito protetor do pré-condicionamento (Jia et al., 2007).

1.5.2 - Proteína Cinase Ativada por Mitógenos regulada por sinais extracelulares (MAPK/ERK)

Na família das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), as cinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs) são componentes essenciais de vias de sinalização que ocasionam uma mudança na função específica de proteínas e expressão gênica. Elas são expressas em abundância no SNC, e são ativadas em resposta a inúmeros estímulos fisiológicos, incluindo atividade e plasticidade sinápticas, influxo de cálcio e neurotrofinas, mas também eventos patológicos como a isquemia e epilepsia. Estudos têm relacionado esta via à formação e atividade de receptores NMDA, uma vez que a inibição desta via diminui consideravelmente a expressão de subunidades NR2B *in vitro* e *in vivo* (Nateri et al., 2007). Outros estudos ainda correlacionam a ação desta via com a ativação de isoformas da PKC, indicando sua participação efetiva no pré-condicionamento pela ativação de receptores NMDA. (Jia et al., 2007).

1.5.3 – Proteína Cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina II (CaMKII)

A proteína cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina II (CaMKII) é uma proteína cinase presente em todos os tecidos, e altamente prevalente no cérebro. Esta proteína é ativada pela sinalização causada pelo íon Ca^{2+} e regula processos neuronais importantes, tais como a síntese e liberação de neurotransmissores, modulação de canais iônicos, transporte e morfologia celulares, extensão de neuritos, plasticidade sináptica, expressão gênica, aprendizado e memória (Yamauchi, 2007). Estudos demonstraram sua ativação acentuada em resposta a um insulto estressante agudo (Suenaga et al., 2006) e outros

demonstram que esta possui uma participação protetora em modelos de episódios epilépticos recorrentes, por manter a homeostase de Ca^{2+} (Carter et. al, 2006).

1.5.4 - Proteína Cinase dependente de AMP cíclico (PKA)

A proteína cinase dependente de AMP cíclico (PKA) é uma proteína cinase efetora de uma via de sinalização crucial para a plasticidade sináptica, manutenção de Potenciação de Longa Duração (LTP) e síntese protéica, bem como a modulação da permeabilidade de receptores NMDA ao íon Ca^{2+} e a ativação da proteína de ligação de elementos dependentes de AMP cíclico (CREB) (Skeberdis et al.,2006; Giordano et al., 2005, Tang et al., 2007). Estudos têm também demonstrado a função desta na transcrição de genes que codificam a subunidade 1 de receptores NMDA, levando a uma maior expressão e incorporação de receptores NMDA (Lau et al., 2004). Outros estudos ainda demonstram que a ativação desta via está relacionada com a toxicidade causada pela ativação de receptores NMDA, uma vez que sua inibição impede a morte neuronal causada pela administração de NMDA *in vitro* (Giordano et al., 2005).

1.6 - Justificativa

Com base nesses estudos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel de vias de sinalização celular no pré-condicionamento por NMDA frente a um insulto com QA. A descoberta e caracterização dos mecanismos responsáveis pela obtenção de um estado de neuroproteção frente a insultos danosos posteriores poderá permitir o desenvolvimento de drogas com aplicação clínica e terapêutica mais segura e eficaz em relação a outras formas de pré-condicionamento, evitando procedimentos e traumas cirúrgicos que por si podem ser potencialmente danosos. Além disso, o pré-condicionamento é uma ferramenta experimental valiosa para aumentar a compreensão de como o cérebro se protege.

Assim sendo, a avaliação da participação destas vias de sinalização poderá esclarecer, ainda que parcialmente, os mecanismos envolvidos no fenômeno do pré-condicionamento químico por NMDA.

1.7 – Objetivos

Este estudo teve como objetivo identificar as vias de sinalização intracelulares envolvidas na proteção e morte celular no pré-condicionamento com NMDA e nas convulsões induzidas pelo ácido quinolínico. Para tal, foi avaliada neste estudo a participação das vias de sinalização da PKC, ERK, PKA e CaMKII no fenômeno do pré-condicionamento químico, bem como o papel destas vias frente às convulsões induzidas por QA.

2 - Materiais e Métodos

2.1 – Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos adultos (30-40 g), mantidos em temperatura de $22 \pm 1^\circ \text{C}$ em um ciclo de 12 horas claro (a partir das 7 horas) e 12 horas escuro, em caixas plásticas com água e ração disponíveis *ad libitum*. Os protocolos para experimentos com animais foram projetados de maneira que o animal tenha o mínimo de sofrimento possível e com limite de animais sacrificados (conforme protocolo aprovado pela CEUA/UFSC).

2.2 - Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral intra-peritoneal (i.p.) à concentração de 7% diluído em Salina 0,9%. (10 mL/Kg do animal) e uma cânula foi implantada para infusão intra-cerebroventricular (i.c.v.) (Schmidt et al., 2000). Em um estereotáxico, a pele do crânio foi removida e uma cânula guia de 30 G/7 mm foi implantada a 1 mm posterior ao bregma, 1 mm á direita da linha mediana, 1 mm abaixo do ventrículo lateral e fixada com cimento acrílico. Os animais foram então retornados às suas respectivas caixas e permaneceram em repouso em local aquecido por 24 horas.

2.3 - Tratamento com Inibidores

Inibidores específicos para as proteínas cinases efetoras das vias de sinalização intracelulares foram infundidos i.c.v. Foram utilizados Queleritrina (1µg/sítio, em 4µl), inibidor específico da PKC, H-89 (1µg/sítio, em 4µl), inibidor da PKA, PD98059 (5µg/sítio, em 4µl), inibidor específico da via de sinalização da ERK, e KN-62 (1µg/sítio, em 4µl), inibidor da CaMKII. Todos os inibidores foram diluídos em salina 0,9%. As doses das drogas foram baseadas no estudo de Almeida et al.(2005). Após a infusão, os animais foram observados por 10 min quanto à ocorrência de alterações comportamentais.

2.4 - Tratamento com NMDA

NMDA, na dose de 75 mg/Kg de animal ou salina (NaCl 0,9%) foram administrados via i.p após 15 min da infusão dos inibidores de proteínas cinases. Os animais foram colocados individualmente em caixas de acrílico (20 x 20 x 20 cm) e observados por 30 min para a ocorrência de alterações comportamentais. Os animais retornaram para suas respectivas caixas e lá permaneceram por 24 horas.

2.5 - Convulsões com Ácido Quinolínico

O ácido quinolínico (36,8 nmol em 4µl) ou salina (4µl) foram administrados i.c.v. através de uma agulha de 30 G/8 mm, introduzida pela cânula, 15 minutos após a administração dos inibidores, ou 24 horas após a administração de NMDA. Os animais

foram colocados em caixas de acrílico e observados por 10 min para a ocorrência de mudanças comportamentais como “wild running” (corrida involuntária), episódios convulsivos tônico ou clônico e convulsão tônico-clônica, que deverá ocorrer por pelo menos 5 segundos (Hallak et al., 1993) e observados quanto à fatalidade decorrente das convulsões. Foram também analisadas a latência e duração dos episódios convulsivos. Os animais pré-tratados com NMDA e/ou inibidores que não apresentaram as convulsões foram considerados protegidos.

2.6 - Análise Estatística

A incidência das convulsões entre os diferentes tratamentos foram comparadas através do teste exato de Fisher. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. As médias de latência e duração das convulsões foram analisadas segundo o método de Análise de Variância de uma Via (ANOVA), seguido do teste post-hoc de Tukey.

3 – Resultados

Em estudos anteriores realizados por Boeck et al. (2004), foi estabelecido que o QA causa episódios convulsivos em 100% dos animais quando infundido i.c.v na dose de 36,8 nmol. Estes mesmos estudos demonstraram que o pré-condicionamento por NMDA protege 53,13% dos animais contra as convulsões causadas pela infusão de QA e no presente estudo foi observada esta mesma taxa de proteção.

Neste estudo foram utilizados diversos inibidores de vias de sinalização intracelulares, e observamos que estes não ocasionaram quaisquer alterações comportamentais nos animais tratados somente com salina (grupos Sal+Ch, Sal+KN, Sal+H, Sal+PD).

Para avaliar a participação da via de sinalização da PKC, foi utilizada a Queleritrina (Ch), um inibidor não-seletivo, que inibe igualmente todas as isoformas da PKC presentes no tecido. A inibição da via de sinalização da PKC com o uso deste inibidor reduziu a taxa de proteção evocada pelo pré-condicionamento por NMDA de 53,13% para 26,6%, mas esta alteração não foi considerada significativa pelo Teste Exato de Fisher. Com isso, o grupo tratado com Queleritrina e NMDA, seguido pela infusão de QA não foi considerado estatisticamente diferente do grupo tratado com Salina e QA e do grupo tratado com NMDA e QA, configurando assim uma redução parcial na taxa de proteção evocada pelo NMDA. A utilização do inibidor somente anterior à infusão de QA não alterou a taxa de convulsão causada pelo QA (Figura 1).

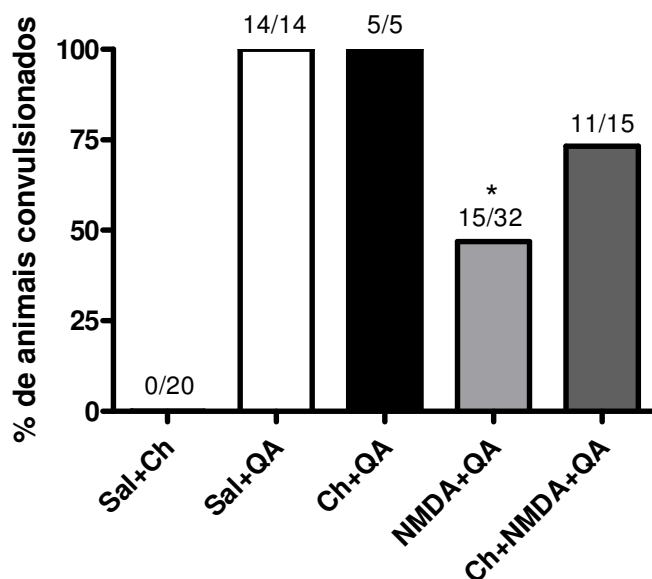


Figura 1. Efeito da Inibição da Proteína Cinase C (PKC) por Queleritrina na proteção causada pelo pré-condicionamento com N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e nas convulsões induzidas por Ácido quinolínico. Os animais receberam veículo (Sal, 0,9 %) ou NMDA (i.p., 75 mg/kg) 24 horas antes da infusão de Ácido Quinolínico (QA) (i.c.v. 36,8 nmol), e Queleritrina (Ch) (i.c.v., 1µg/sítio), um inibidor da PKC, 15 minutos antes de receberem NMDA (Ch+NMDA+QA) ou antes da infusão de QA (Ch+QA). O número de animais utilizados em cada grupo está descrito acima do gráfico. * Representa a diferença em relação ao grupo Sal+QA e Ch+QA ($P < 0,05$) segundo o teste exato de Fisher.

A inibição da via de sinalização da CaMKII pelo inibidor KN-62 (KN) reverteu parcialmente a taxa de proteção evocada pelo pré-condicionamento por NMDA. A redução da taxa de 53,13% para 26,6% não foi considerada significativa por meio do teste exato de Fisher. Da mesma forma, o grupo tratado com KN-62 e NMDA seguido da infusão de QA não foi considerado estatisticamente diferente do grupo tratado com NMDA e QA e do grupo tratado com Salina e QA. A utilização do inibidor somente anterior à infusão de QA não alterou a taxa de convulsão causada pelo QA (Figura 2).

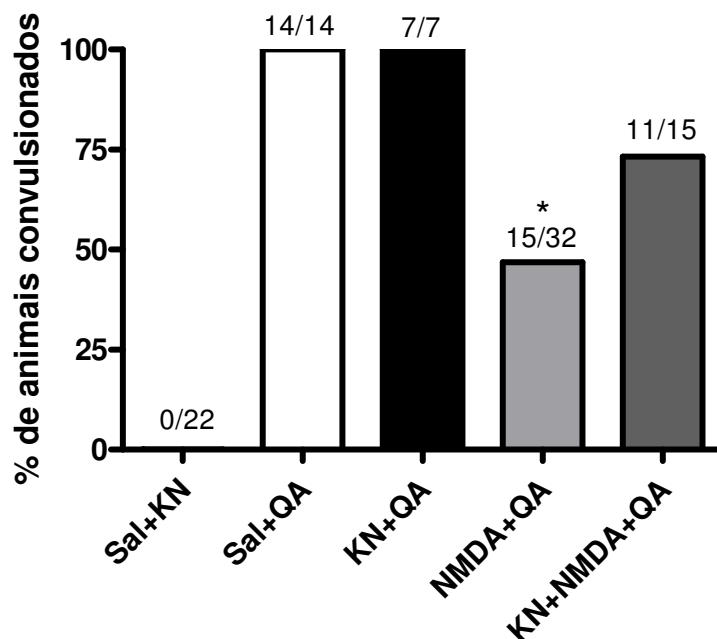


Figura 2. Efeito da Inibição da Proteína Cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina II (CaMKII) por KN-62 na proteção causada pelo pré-condicionamento com N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e nas convulsões induzidas por Ácido quinolínico. Os animais receberam veículo (Sal, 0.9%) ou NMDA (i.p., 75mg/kg) 24 horas antes da infusão de Ácido Quinolínico (QA) (i.c.v. 36,8 nmol), e KN-62 (KN) (i.c.v., 1 μ g/sítio), um inibidor da CaMKII, 15 minutos antes de receberem NMDA (KN+NMDA+QA) ou antes da infusão de QA (KN+QA). O número de animais utilizados em cada grupo está descrito acima do gráfico. * Representa a diferença em relação ao grupo Sal+QA e KN+QA ($P < 0,05$) segundo o teste exato de Fisher.

A inibição da via de sinalização da PKA pelo inibidor H-89 (H) foi capaz de reverter totalmente a proteção evocada pelo pré-condicionamento com NMDA, e esta reversão foi considerada estatisticamente significativa pelo teste de Fisher ($P < 0,05$). O grupo que recebeu H-89 e NMDA, seguido da infusão de QA foi considerado semelhante ao grupo tratado com Salina e QA, e a administração somente do inibidor contra as convulsões provocou uma pequena redução de 14,3% na taxa de convulsão, mas esta não foi considerada significativa (Figura 3).

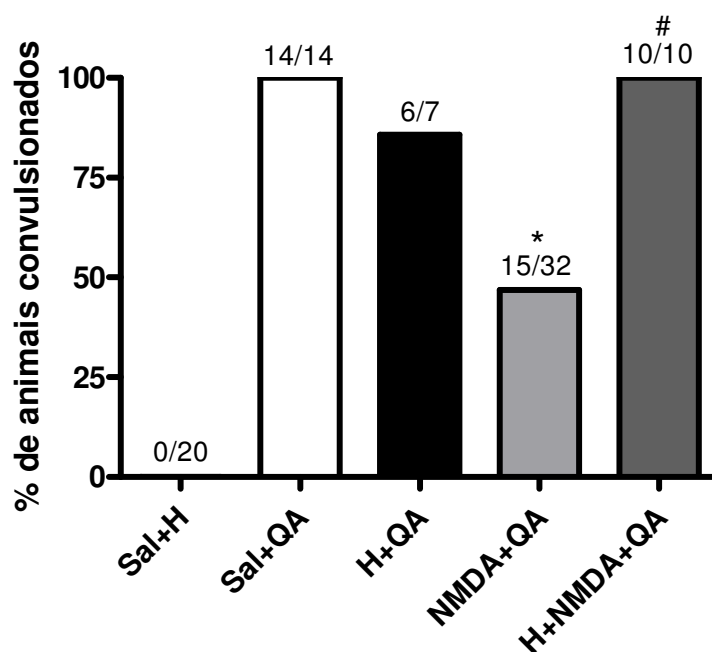


Figura 3. Efeito da Inibição da Proteína Cinase A (PKA) por H-89 na proteção causada pelo pré-condicionamento com N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e nas convulsões induzidas por Ácido quinolínico. Os animais receberam veículo (Sal, 0.9%) ou NMDA (i.p., 75mg/kg) 24 horas antes da infusão de Ácido Quinolínico (QA) (i.c.v. 36,8 nmol), e H-89 (H) (i.c.v., 1µg/sítio), um inibidor da PKA, 15 minutos antes de receberem NMDA (H+NMDA+QA) ou antes da infusão de QA (H+QA). O número de animais utilizados em cada grupo está descrito acima do gráfico. * Representa a diferença em relação ao grupo Sal+QA e H+QA ($P < 0,05$).; # Representa a diferença em relação ao grupo NMDA+QA ($P < 0,05$ pelo teste exato de Fisher).

A inibição da ativação da via de sinalização da MEK/ERK por meio da utilização de um inibidor seletivo da MEK (PD098059), causou uma reversão parcial, na proteção evocada pelo pré-condicionamento com NMDA, reduzindo a taxa de proteção a 12,5%. Esta redução foi considerada significativa pelo teste exato de Fisher. O uso do inibidor apenas contra as convulsões resultou em uma pequena redução na taxa de convulsão, não estatisticamente significativa (Figura 4).

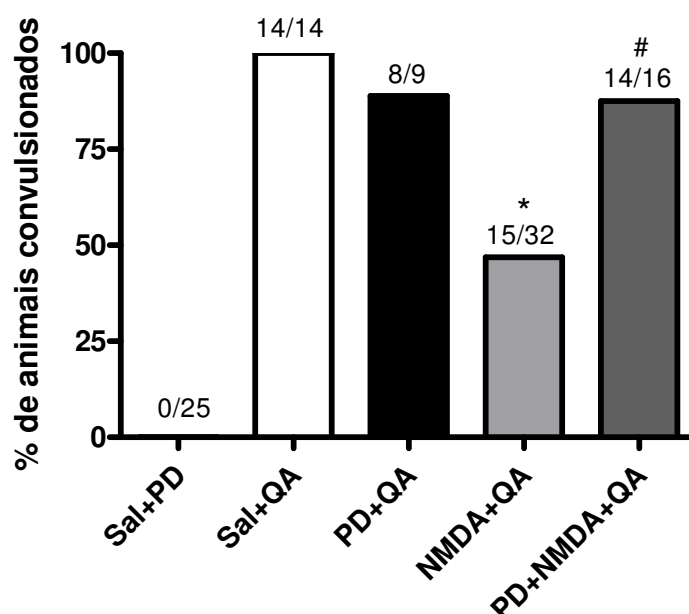


Figura 4. Efeito da Inibição da ativação da Proteína Cinase Ativada por Mitógenos regulada por sinais extracelulares (MAPK/ERK) por PD98059 na proteção causada pelo pré-condicionamento com N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e nas convulsões induzidas por Ácido quinolínico. Os animais receberam veículo (Sal, 0.9%) ou NMDA (i.p., 75mg/kg) 24 horas antes da infusão de Ácido Quinolínico (QA) (i.c.v. 36,8 nmol), e PD98059 (PD) (i.c.v., 5µg/sítio), um inibidor seletivo da MEK, 15 minutos antes de receberem NMDA (PD+NMDA+QA) ou antes da infusão de QA (PD+QA). O número de animais utilizados em cada grupo está representado pelos numerais acima do gráfico. * Representa a diferença em relação ao grupo Sal+QA e PD+QA ($P < 0,05$). # Representa a diferença em relação ao grupo NMDA+QA ($P < 0,05$ para o grupo PD+NMDA+QA) segundo o teste exato de Fisher.

O tratamento dos animais com Queleritrina, seguida após 15 minutos pela aplicação de QA, resultou em uma taxa de mortalidade de 100% dos animais. Essa taxa foi considerada estatisticamente diferente da taxa de mortalidade do grupo tratado com salina e QA, e do grupo tratado com NMDA e QA. (Figura 5A).

O tratamento com o inibidor PD98059, 15 minutos antes da infusão de QA resultou em uma taxa de mortalidade elevada, considerada estatisticamente diferente do grupo que recebeu salina e QA e do grupo que recebeu NMDA e QA. O tratamento com este inibidor e o pré-condicionamento por NMDA seguido pela infusão do QA não alterou significativamente a taxa de mortalidade em relação aos demais grupos. (Figura 5D)

Os tratamentos com os demais inibidores (KN-62 e H-89) não alteraram de forma significativa a taxa de mortalidade, quando comparados aos grupos controle. (Figuras 5B e C).

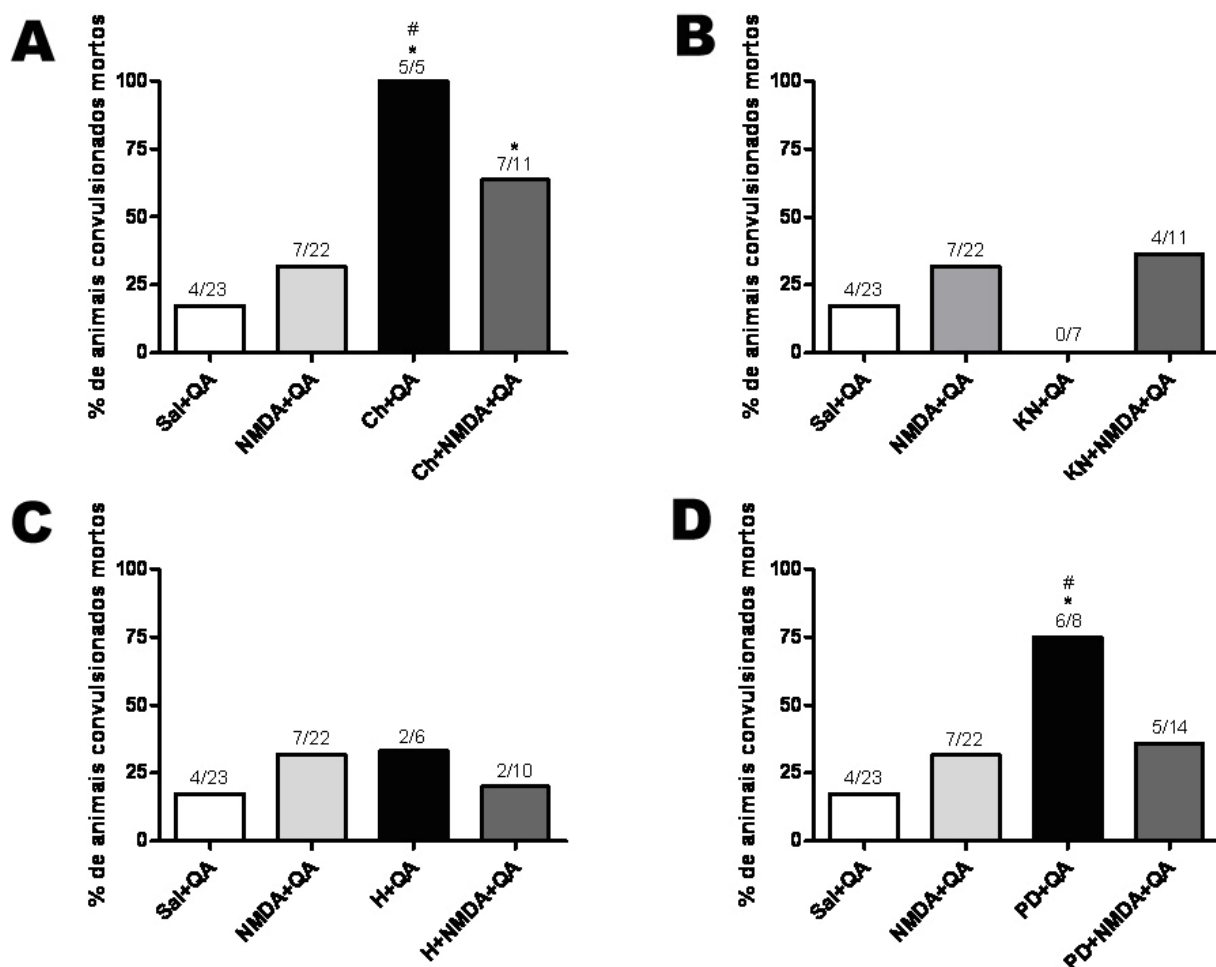


Figura 5. Mortalidade dos animais nos diferentes tratamentos:

Os animais receberam veículo (Sal, 0.9%) ou NMDA (i.p., 75mg/kg) 24 horas antes da infusão de Ácido Quinolínico (QA) (i.c.v. 36,8 nmol) (grupos Sal+QA e NMDA+QA, respectivamente), e os inibidores Queleritrina (Ch) (i.c.v., 1µg/sítio) (A), KN-62 (KN) (i.c.v., 1µg/sítio) (B), H-89 (H) (i.c.v., 1µg/sítio) (C) ou PD98059 (PD) (i.c.v., 5µg/sítio) (D) 15 minutos antes de receberem NMDA ou antes da infusão de QA (Ch+QA). * Diferença em relação ao grupo Sal+QA ($P < 0,05$). # Diferença em relação ao grupo NMDA+QA ($P < 0,05$), segundo o teste exato de Fisher. O número de animais mortos em decorrência do tratamento em cada grupo está representado pelos numerais acima do gráfico.

Os tratamentos com os inibidores KN-62, H-89 e PD98059 em conjunto com a infusão de QA, ou o pré-condicionamento por NMDA seguida da infusão de QA não alteraram significativamente a latência para a primeira convulsão e a duração das convulsões causadas pelo QA (Figuras 6A e 6B). A latência para a primeira convulsão e duração das convulsões no tratamento com Queleritrina não foram avaliadas.

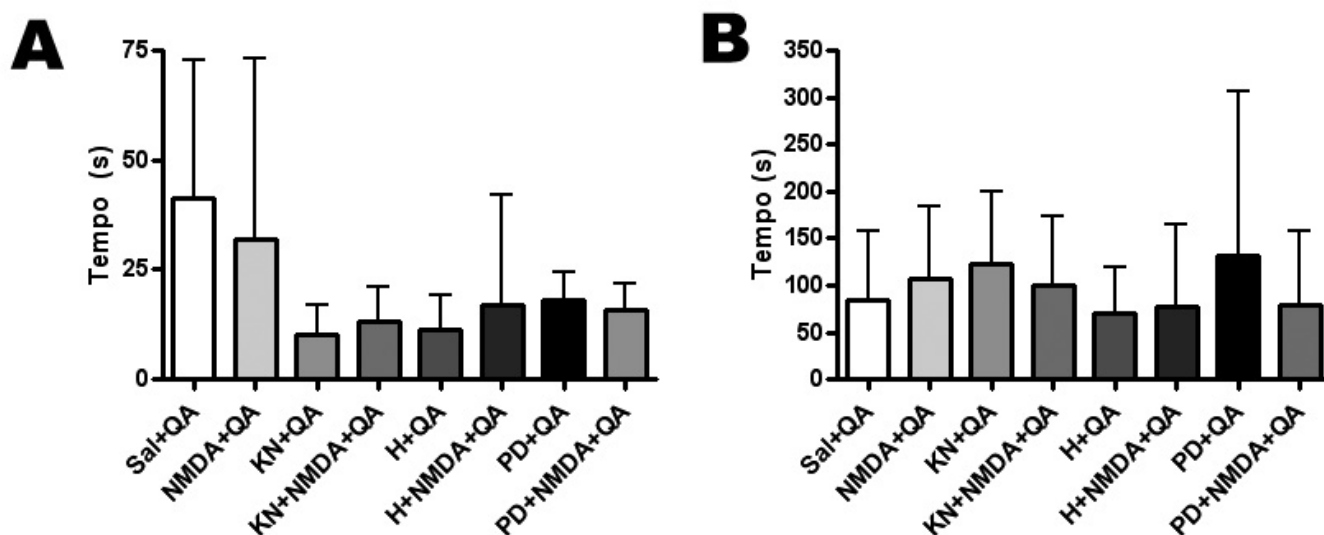


Figura 6. Latência (A) e Duração (B) das convulsões induzidas por Ácido Quinolínico nos diferentes tratamentos: Os animais receberam veículo (Sal, 0.9%) ou NMDA (i.p., 75mg/kg) 24 horas antes da infusão de Ácido Quinolínico (QA) (i.c.v. 36,8 nmol) (grupos Sal+QA e NMDA+QA, respectivamente), e os inibidores Queleritrina (Ch) (i.c.v., 1µg/sítio), um inibidor da PKC, KN-62 (KN) (i.c.v., 1µg/sítio), inibidor da CaMKII, H-89 (H) (i.c.v., 1µg/sítio), inibidor da PKA ou PD98059 (PD) (i.c.v., 5µg/sítio), 15 minutos antes de receberem NMDA (Ch+NMDA+QA, KN+NMDA+QA, H+NMDA+QA e PD+NMDA+QA, respectivamente) ou antes da infusão de QA (Ch+QA, KN+QA, H+QA e PD+QA, respectivamente). Os valores representam a em média \pm desvio padrão. (n: 3-13 por grupo)

4 – Discussão

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos e a ativação de seus receptores está envolvida em processos fisiológicos e patológicos. A ativação excessiva dos receptores NMDA pode induzir morte celular tanto por apoptose como por necrose (Nicholls & Budd, 1998; Arundine & Tymianski, 2003). Demonstrou-se que a injeção intra-hipocampal de cainato em ratos provoca morte celular com características necróticas e apoptóticas (Chang et al, 2005), assim como o glutamato promove morte celular com características apoptóticas em fatias de hipocampo (Molz et al, 2005).

O QA é um agonista de receptores NMDA envolvido com a toxicidade celular através da geração de radicais livres, distúrbio da transmissão glutamatérgica e está associado a diversas condições patológicas do SNC (Stone & Darlington, 2002). Neste estudo foram avaliadas a participação das vias de sinalização intracelulares na obtenção de um estado protetor decorrente de um pré-condicionamento químico, e seu envolvimento no processo convulsivo causado pela infusão de QA.

4.1 – Queleritrina e PKC

A via de sinalização intracelular da PKC tem sido relacionada a vários processos de elevada importância, dentre os quais podem ser destacados a sobrevivência e morte celulares. Estudos como o de Chou et. al. (2005) e Barnett et al. (2007), demonstraram que algumas isoformas da família da PKC são mais prevalentes no cérebro, e que elas são mais fortemente implicadas com a morte ou com a sobrevivência celular, sendo que

estas considerações variam de acordo com a isoforma estudada e com o estudo realizado. Como exemplo desta dicotomia inerente à família das PKCs, temos que a sua isoforma PKC ϵ vem sido comumente relacionada à ocorrência de excitotoxicidade glutamatérgica, e sua inibição foi comprovada como sendo um dos fatores de neuroproteção no modelo de pré-tratamento por estrógeno (Jung et al. 2005), enquanto a sua isoforma PKC γ foi vista como uma efetora positiva quando ativada no mesmo modelo de pré-tratamento (Hayashi et. al 2005). Por outro lado, temos que a isoforma PKC ϵ tem sido também relacionada com a proteção evocada pelo pré-condicionamento isquêmico, visto que a sua inibição específica pelo peptídeo ϵ V1-2 é capaz de abolir totalmente a proteção evocada por um pré-condicionamento isquêmico, e sua ativação específica por $\Psi\epsilon$ -RACK mimetiza o efeito protetor deste mesmo modelo de pré-condicionamento (Raval et al., 2003). Outros estudos ainda implicam a isoforma PKC δ como efetora crucial no estabelecimento de um estado de proteção endógeno (Saito et. al, 2008, comunicação pessoal).

O fato da taxa de mortalidade ser absoluta quando da infusão da Queleritrina antes da infusão de Ácido Quinolínico corrobora a hipótese de que esta família de enzimas exerça um papel crucial sobre sobrevivência celular. Além disso, o fato de esta taxa de mortalidade de 100% não ser observada quando da aplicação do pré-condicionamento com NMDA em conjunto com a Queleritrina abre a possibilidade de que a PKC participe, ainda que de forma discreta, no processo de neuroproteção evocada por NMDA ou que a aplicação de NMDA ative outras vias de sinalização que promovam a sobrevivência, ou impeçam a morte celular.

A mortalidade decorrente da utilização da Queleritrina neste modelo pode ser devido ao fato de este inibidor ser não-seletivo, e inativar todas as isoformas da PKC.

Essa inibição indiscriminada poderia inibir também a ação de isoformas relacionadas à proteção e sobrevivência celular, impedindo processos endógenos de resposta ao estresse imediato e de recuperação celular. Estudos como o de Raval et al. (2003) demonstraram similarmente que a inibição da PKC por Queleritrina não é capaz de reverter a proteção evocada por um pré-condicionamento isquêmico, mas a inibição específica da isoforma PKC ϵ foi capaz de reverter esta proteção.

4.2 – KN-62 e CaMKII

A ativação da via de sinalização da CaMKII é relacionada à aquisição de uma “resistência” neuronal a insultos danosos e à regulação da homeostase do íon Ca²⁺ no meio intracelular quando da ocorrência de excitotoxicidade glutamatérgica (Carter et al., 2006; Suh et al. 2005). Estudos realizados por Carter et al (2006) demonstraram que a redução da atividade desta via de sinalização resulta na ocorrência de descargas espontâneas epileptiformes recorrentes, e isto seria um indicativo de que esta via exerce um papel fundamental na resposta neuronal a um insulto excitotóxico.

Pôde ser observado neste estudo que a inibição desta via por KN-62 não aboliu o estado de proteção evocado pelo pré-condicionamento por NMDA, reduzindo apenas a taxa de proteção de 53,13% para 26,6%, o que estatisticamente não foi considerado significativo.

Entretanto, esta redução parcial é condizente com os resultados obtidos por Tauskela et al. (2003), que observou a participação da via da CaMKII nos modelos de pré-condicionamento isquêmico e por NMDA em culturas corticais de camundongos. Este estudo em particular demonstrou que a inibição da via da CaMKII por KN-62 é

capaz de abolir parcialmente os pré-condicionamentos isquêmico e por NMDA frente a um episódio isquêmico letal, mas não frente a um insulto letal por NMDA. Apesar disso, estes mesmos estudos demonstraram que a inibição da CaMKII por si só confere às células resistência a um insulto letal por NMDA.

A partir destes resultados, pode-se inferir que esta via exerce ao menos uma participação discreta neste processo, e que a ativação da CaMKII seja necessária para a obtenção de um estado neuroprotetor.

4.3 – H-89 e PKA

Estudos têm demonstrando a relação da via de sinalização da PKA com a ativação de receptores NMDA, sendo esta ativada após a ativação destes receptores (Giordano et al., 2005) e exercendo a modulação da permeabilidade dos receptores NMDA ao íon Ca^{2+} quando de sua ativação (Skeberdis et al., 2006). Os dados obtidos no presente estudo são condizentes com esta correlação da PKA com os receptores NMDA, visto que a inibição desta via por H-89 foi capaz de reverter totalmente a proteção evocada pelo pré-condicionamento por NMDA.

Estudos como o de Tang et al. (2007) têm sugerido que a ativação da PKA levaria à maior expressão e fosforilação de subunidades NR1, e à incorporação destas na membrana. Este processo seria então responsável pelo aumento na corrente mediada por receptores NMDA, e pela facilitação da excitabilidade neuronal em alguns modelos. A avaliação da expressão das subunidades dos receptores NMDA quando da inibição da PKA no modelo de pré-condicionamento por NMDA é um ponto possível de ser explorado em estudos futuros.

Além disso, outros estudos demonstraram que a ativação da via de sinalização da PKA é necessária para a incorporação de receptores AMPA nos terminais sinápticos, através da fosforilação das subunidades GluR1 destes mesmos receptores (Man et al., 2006; Yang et al., 2008). Outros estudos, como o de Lu et al.(2004), demonstraram que um estímulo excitatório breve leva a um aumento significativo da corrente mediada por receptores AMPA, e esta corrente se torna muito mais intensa que a mediada por receptores NMDA após 24 horas. Visto que o pré-condicionamento por NMDA mostra-se mais evidente 24 horas após a sua administração, há a possibilidade que este aumento na expressão de receptores AMPA esteja envolvido direta ou indiretamente no fenômeno da neuroproteção.

Desta forma, a avaliação da expressão e incorporação dos receptores AMPA quando do pré-condicionamento e da inibição da via de sinalização da PKA neste mesmo modelo poderia esclarecer os mecanismos envolvidos no pré-condicionamento por NMDA.

4.4 – PD98059 e ERK

A via sinalizadora da ERK é frequentemente relacionada à obtenção de LTP decorrente da ativação de receptores NMDA. Estudos comprovaram a atividade desta enzima neste processo, visto que a inibição desta via por PD98059 foi capaz de impedir a ocorrência de LTP após a ativação de receptores NMDA (Toyoda et al. 2007). Os resultados obtidos no presente estudo reforçam a hipótese de que esta via esteja intimamente relacionada à ativação de receptores NMDA, uma vez que a inibição desta

via foi capaz de provocar uma redução parcial, mas estatisticamente significativa na taxa de proteção evocada pelo pré-condicionamento por NMDA.

Entretanto, há a possibilidade de esta redução estar sendo subestimada, devido ao fato do inibidor utilizado neste estudo (PD98059) ser de fato um inibidor da MAPK/ERK Cinase (MEK), que é responsável pela fosforilação, e conseqüente ativação da ERK. Assim sendo, é possível que a ERK esteja ativa mesmo que a atividade da MEK esteja inibida, por intermédio de outras vias de sinalização. Estudos como o de Gao et al. (2008), já postularam a existência de uma comunicação (cross-talk) entre as vias sinalizadoras da ERK e da PKC, e que esta comunicação seria crucial na obtenção de um estado de neuroproteção endógeno.

Os dados obtidos quanto à mortalidade dos animais com a utilização desse inibidor (PD98059) sugerem que esta via esteja envolvida na resposta a um estresse agudo, e na recuperação e sobrevivência celulares quando da ocorrência de um insulto por QA. Esta taxa de mortalidade é estatisticamente semelhante à apresentada com a inibição da PKC, o que pode sugerir que ambas estas vias estejam relacionadas à proteção obtida pelo pré-condicionamento. A taxa de mortalidade não foi elevada quando da utilização do inibidor com a aplicação de NMDA, o que poderia ser atribuído à ativação pelo NMDA de outras vias que impeçam a morte, ou promovam a sobrevivência celular. Desta forma, a avaliação da taxa de proteção e da mortalidade quando da inibição destas vias em conjunto poderia ser o foco de estudos futuros.

Estudos como os de Boeck et al. (2004) e Vandresen-Filho et al. (2007) estabeleceram a latência e duração médias das convulsões induzidas pela infusão de QA, e demonstraram que o pré-condicionamento por NMDA não altera de maneira significativa estas médias.

No presente estudo pode ser observado que o uso dos inibidores das vias sinalizadoras da PKA, CaMKII e ERK, tanto diretamente seguidos pela infusão de QA ou seguidos pela aplicação de NMDA não foi capaz de alterar a latência da primeira convulsão e a duração dos episódios convulsivos de maneira significativa, sugerindo que estas vias não tenham influência direta sobre estes fatores. No entanto, o presente estudo não teve como objetivo observar e caracterizar os episódios convulsivos individualmente, o que talvez poderia revelar novos detalhes e informações sobre o processo convulsivo decorrente da ativação de receptores NMDA e sobre a influência da ativação de certas vias de sinalização na intensidade das convulsões provocadas pela infusão de QA.

Além disto, neste estudo não foram avaliadas todas as possíveis vias de sinalização envolvidas no pré-condicionamento com NMDA e na toxicidade induzida por QA. Outras vias de sinalização celular associadas à sobrevivência celular, como a via da Fosfatidil-inositol-3 Cinase (PI3K), ou vias associadas à morte celular como as vias da p38^{MAPK} e c-Jun N-terminal Cinase (JNK), poderão ser futuramente analisadas para a melhor compreensão dos mecanismos associados à neuroproteção pelo pré-condicionamento e à neurotoxicidade induzida pela exacerbação do sistema glutamatérgico promovida pelo QA.

5 – Conclusões

- A inibição das vias de sinalização intracelulares da PKC e da CaMKII não foi capaz de reduzir de forma significativa a taxa de proteção evocada pelo pré-condicionamento por NMDA.
- A inibição específica da via de sinalização da PKA resultou na abolição total da proteção evocada pelo pré-condicionamento por NMDA, evidenciando assim o papel desta via neste modelo de pré-condicionamento.
- A inibição da via de sinalização da ERK resulta na redução da taxa de proteção evocada pelo pré-condicionamento por NMDA a 12,5%, sendo esta redução considerada significativa estatisticamente..
- A inibição da via da PKC ocasiona uma taxa de mortalidade de 100% quando seguida da infusão de QA, e uma taxa de mortalidade de 63,6% quando seguida do pré-condicionamento por NMDA e pela infusão de QA.
- A inibição da via de sinalização da ERK resulta em uma taxa de mortalidade de 75% quando seguida da infusão de QA.
- A inibição das vias de sinalização da PKA e CaMKII não altera as taxas de mortalidade quando seguida da infusão de QA, ou quando seguida pelo pré-condicionamento por NMDA e infusão de QA.
- A inibição das vias de sinalização da PKA, CaMKII e ERK não surtiu efeito na latência e na duração das convulsões induzidas por QA.

6 – Referências Bibliográficas

AARTS, M.M.; TYMIANSKI, M. Novel treatment of excitotoxicity: targeted disruption of intracellular signaling from glutamate receptors. *Biochem. Pharmacol.* v.66, p.877-886, 2003.

AHMADIAN G.; JU W.; LIU L.; WYSZYNSKI M.; LEE S.H.; DUNAH A.W.; TAGHIBIGLOU C.; WANG Y.; LU J.; WONG T.P.; SHENG, M.; WANG Y.T. Tyrosine phosphorylation of GluR2 is required for insulin-stimulated AMPA receptor endocytosis and LTD. *EMBO Journal.* v.10;23, p.1040-1050, 2004.

ALMEIDA R.C.; SOUZA D.G.; SOLETTI R.C.; LÓPEZ M.G.; RODRIGUES A.L.S.; GABILAN N.H. Involvement of PKA, MAPK/ERK and CaMKII, but not PKC in the acute antidepressant-like effect of memantine in mice. *Neuroscience Letters.* v.395, p.93-97, 2005.

ARUNDINE, M.; TYMIANSKI, M. Molecular Mechanisms of Calcium-dependent neurodegeneration in Excitotoxicity. *Cell Calcium.* V.34, p.325-337, 2003.

BARNETT, M.E.; MAGDWICK, D.K., TAKEMOTO, D.J. Protein Kinase C as a stress sensor. *Cellular Signaling.* v.19, p.1820-1829, 2007.

BOECK, C.R.; GANZELLA, M.; LOTTERMANN, A.; VENDITE, D. NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. *Epilepsia*. v.45, p.745-750, 2004.

BOECK, C.R.; KROTH, E.H.; BRONZATTO, M.J.; VENDITE, D. Effect of the L- or D-aspartate on ecto-5' nucleotidase activity and on cellular viability in cultured neurons: participation of the adenosine A_{2A} receptors. *Amino Acids*. v.33, p.439-444, 2007.

BOND, A.; LODGE, D.; HICKS, C.A.; WARD, M.A.; O'NEILL, M.J. NMDA receptor antagonism, but not AMPA receptor antagonism attenuates induced ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus. *Eur J Pharmacol*. v.10, p.91-99, 1999.

CARTER, D.S.; NAQEEB HAIDER, S.; BLAIR, R.E; DESHPANDE, L.S; SOMBATI, S.; DELORENZO, R.J. Altered Calcium/Calmodulin Kinase II Activity Changes Calcium Homeostasis That Underlies Epileptiform Activity in Hippocampal Neurons in Culture. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v.319, p.1021-1031, 2006.

CHANG, A.Y.; WANG, C.H.; CHIU, T.H.; CHI, J.W.; CHEN, C.F.; HO, L.T.; LIN, A.M.Y. Hypoxic preconditioning attenuated in kainic acid-induced neurotoxicity in rat hippocampus. *Exp Neurol*. v.195, p. 40-48, 2005.

CHOU, W.H.; MESSING, R.O. Protein Kinase C Isozymes in Stroke. *Trends in Cardiovascular Medicine*. v.15, p.47-51, 2005.

CULL-CANDY, S.; BRICKLEY, S.; FARRANT, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol.*, v.11, p.327–335, 2001.

DIRNAGL, U.; SIMON, R.P.; HALLENBECK, J.M. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci.* v.26 p.248-54, 2003.

FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* v.42, p.1-11, 1984

GAO, X.; ZHANG, H.; TAKAHASHI, T.; HSIEH, J.; LIAO, J.; STEINBERG, G.K.; ZHAO, H. The Akt signaling pathway contributes to postconditioning's protection against stroke; the protection is associated with the MAPK and PKC pathways. *Journal of Neurochemistry.* v.105, p.943-955, 2008.

GIBB, A. J. NMDA receptor subunit gating – uncovered. *Trends Neurosci.* v.27, p.7-10, 2004.

GIORDANO, G.; SÁNCHEZ-PÉREZ, A.M.; MONTOLIU, C.; BEREZNEY, R.; MALYAVANTHAM, K.; COSTA, L.G.; CALVETE, J.J.; FELIPO V. Activation of NMDA receptors induces protein kinase A-mediated phosphorylation and degradation of matrix 3. Blocking these effects prevents NMDA-induced neuronal death. *Journal of Neurochemistry.* v.94, p.808-818, 2005.

GUBELLINI, P.; PISANI, A.; CENTONZE, D.; BERNARDI, G.; CALABRESI, P. Metabotropic glutamate receptors and striatal synaptic plasticity: implications for neurological diseases. *Prog Neurobiol.* v.74, p.271-300, 2004.

HALLAK, M.; IRTENKAUF, S.M.; JANUSZ, C.A.; COTTON, D.B. Stimulation and inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in rats: developing a seizure model. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* v.169, p.695-700, 1993.

HAYASHI, S.; UEYAMA, T.; KAJIMOTO, T.; YAGI, K.; KOHMURA, E.; SAITO, N. Involvement of γ Protein kinase C in estrogen-induced neuroprotection against focal brain ischemia through G protein-coupled estrogen receptor. *Journal of Neurochemistry.* v.93, p.883-891, 2005.

HYND, M.R.; SCOTT, H.L.; DODD, P.R. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* v.45 p. 583-95, 2004.

IZQUIERDO, I. Pre and Postsynaptic events in long term potentiation in memory. *FASEB.* v.8, p.1113-1139, 1989.

JIA J., WANG X., LI H., HAN S., ZU P., LI J. Activations of nPKC ϵ and ERK1/2 were involved in oxygen-glucose deprivation-induced neuroprotection via NMDA receptors in hippocampal slices of mice. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology.* v.19, p.18-24, 2007.

JUNG, M.; WATSON, D.G.; SIMPKINS, J.W.; Suppression of protein kinase C ϵ mediates 17 β -estradiol-induced neuroprotection in an immortalized hippocampal cell line. *Journal of Neurochemistry*. v. 95, p.745-755, 2005.

LAPIN, I. P. Stimulant and convulsive effects of kynurenines injected into brain ventricles in mice. *J Neural Transm*. v.42, p.37-43, 1978.

LAU, G.C.; SAHA, S.; FARIS, R.; RUSSEK S.J. Up-regulation of NMDAR1 subunit gene expression in cortical neurons via a PKA-dependent pathway. *Journal of Neurochemistry*. v.88, p.564-575, 2004.

LU W., CONSTANTINE-PATON M. Eye opening rapidly induces synaptic potentiation and refinement. *Neuron*. V.43, p.237-249, 2004.

LYNCH, D.R.; GUTTMANN, R.P. Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v.300, p.717-723, 2002.

MAN, H.Y.; SEKINE-AIZAWA, Y.; HUGANIR, R.L. Regulation of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor trafficking through PKA phosphorylation of the Glu receptor 1 subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v.109, p.3579-3584, 2006.

MATSUMOTO, S.; SHAMLOO, M.; MATSUMOTO, E.; ISSHIKI, A.; WIELOCH, T. Protein Kinase C- γ and Calcium/Calmodulin-dependent Kinase II- α are persistently translocated to cell membranes of the rat brain during and after middle cerebral artery occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. v.24, p.54-62, 2004.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *J. Nutr.* v.130, p.1007S-1015S, 2000.

MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U.; MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metabolic Brain Disease*. v.19, p. 151-167, 2004.

MIAO, B.; YIN, X.H.; PEI, D.S.; ZHANG Q.G.; ZHANG, G.Y. Neuroprotective effects of preconditioning ischemia on ischemic brain injury through down-regulating activation of JNK1/2 via N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Akt1 activation. v. 280 p.21693-21699, 2005.

MOLZ, S.; DECKER, H.; OLIVEIRA, I.J.; SOUZA, D.O.; TASCA, C.I. Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. *Neurochem Res*. v.30, p.83-89, 2005.

MORONI, F. Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites. *European Journal of Pharmacology*. v.375, p.87–100, 1999.

NAREDO, I V.; POEGGELER, B.; SANCHES, V. S.; CABALLERO,B.; ZAPICO, C.T.; GARCIA, O. A.; TOLIVIA, D.; COLUNGA, M. R.; MONTES, A. C. Melatonin neutralizes neurotoxicity induced by quinolinic acid in brain tissue culture. J Pineal Res. v.39, p.266-75, 2005.

NATERI, A.S.; RAIVICH, G.; GEBHARDT, C.; DA COSTA, C.; NAUMANN, H; VREUGDENHIL, M.; MAKWANNA, M.; BRANDNER, S.; ADAMS, R.; JEFFERYS, J.G.R.; KANN, O.; BEHRENS, A. ERK activation causes epilepsy by stimulating NMDA receptor activity. The European Molecular Biology Organization Journal. v.26, p.4891-4901, 2007.

NEDERGAARD, M.; TAKANO, T.; HANSEN, A. J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. Nature Rev. Neurosci. v.3, p.748-755, 2002.

NELSON, T.J.; SUN, M.K.; HONGPAISAN, J.; ALKON, D. Insulin, PKC signaling pathways and synaptic remodeling during memory storage and neuronal repair. European Journal of Pharmacology. v.585, p.76-87, 2008.

NICHOLLS, D.G.; BUDD, S.L. Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity. Biochim Biophys Acta. v.1366, p.97-112, 1998.

OBRENOVITCH, T.P. & URENJAK, J. Altered Glutamatergic Transmission in Neurological Disorders: From High Extracellular Glutamate to Excessive Synaptic Efficacy. Progr. Neurobiol. v.51, p.39-87, 1997.

POPESCU, G.; AUERBACH, A. The NMDA Receptor Gating Machine: Lessons from Single Channels. *Neuroscientist*. v.10, p.192-198, 2004.

PUISIEUX, F.; DEPLANQUE, D.; BULCKAEN, H.; MABOUDOU, P.; GELÉ, P.; LHERMITTE, M.; LEBUFFE, G.; BORDET, F. Brain ischemic preconditioning is abolished by antioxidant drugs but does not up-regulate superoxide dismutase and glutathione peroxidase. *Brain Research*. v.1027, p. 30-37, 2004.

RAVAL, A.P.; DAVE, K.R.; MOCHLY-ROSEN, D.; SICK, T.J.; PÉREZ-PINZÓN, M.A. ϵ PKC is required for the induction of tolerance by Ischemic and NMDA-Mediated Preconditioning in the organotypic hippocampal slice. *The Journal of Neuroscience*. v.23, p.384-191, 2003.

REJDAK, R.; REJDAK, K.; SIEKLUCKA, DZIUBA, M.; STELMASIAK, Z.; GIEB, P. Brain tolerance and preconditioning. *Pol J Pharmacol*. v.53, p.73-79, 2001.

SAMOILOV, M.O; LAZAREVICH, E.V; SEMENOV, D.G; MOKRUSHIN, A.A; TYUL'KOVA, E.I; ROMANOVSKII, D.Y; MILYAKOVA, E.A; DUDKIN, K.N; The adaptive effects of hypoxic preconditioning of brain neurons. *Neurosci Behav Physiol*. v.33, p.1-11, 2003.

SCHALLER, B; GRAF, R. Cerebral ischemic preconditioning. An experimental phenomenon or a clinically important entity of stroke prevention? *J Neurol*. v.249 p.1503-1511, 2002.

SCHMIDT, A.P.; LARA, D.R.; MARAHIN, J.F.; PERLA, A.S.; SOUZA, D.O.
Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res.*, v. 864, p. 40-43, 2000.

SCHORGE, S.; COLQUHOUN, D. Studies of NMDA Receptor Function and Stoichiometry with Truncated and Tandem Subunits. *J Neurosci.* v.23, p.1151–1158, 2003.

SCHWARCZ, R.; PELLICCIARI, R. Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp Ther.* v.303, p.1-10, 2002.

SCOTT, D.B.; BLANPIED, T.A.; EHLERS, M.D. Coordinated PKA and PKC phosphorylation suppresses RXR-mediated ER retention and regulates the surface delivery of NMDA receptors. *Neuropharmacology.* v. 45, p.755–767, 2003.

SKEBERDIS, V.A.; CHEVALEYRE, V.; LAU, C.G.; GOLDBERG, J.H.; PETTIT, D.L.; SUADICANI, S.O.; LIN, Y.; BENNETT, M.; YUSTE, R.; CASTILLO, P.E.; ZUKIN, R.S. Protein Kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. *Nature Neuroscience.* v.9, p.501-510, 2006.

STONE, T.W. Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Progress in Neurobiology.* v.64 p.185–218, 2001.

STONE, T. W.; DARLINGTON, L. G. Endogenous Kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* v.1, p. 609-620, 2002.

SUENAGA, T., MORINOBU S., YAMAWAKI S. Influence of stress on the activation of CaMKII in the brain. *Japanese Journal of Neuropsychopharmacology.* v.26, p.169-175, 2006.

SUH, H.W.; LEE, H.K.; SEO, Y.J.; KWON, M.S.; SHIM, E.J.; LEE, J.Y.; CHOI, S.S.; LEE, J.H. Kainic acid (KA)-induced Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) expression in the neurons, astrocytes and microglia of the mouse hippocampal CA3 region, and the phosphorylated CaMK II only in the hippocampal neurons. *Neuroscience Letters.* v.381, p.223-227, 2005.

SWANSON, C.J.; BURES, M.; JOHNSON, M. P; LINDEN, A.; MONN, J. A; SCHOEPP, D. D. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nat Rev Drug Discov.* v.4, p.131-144, 2005.

TAKAGI, N.; SASAKAWA, K.; BESSHOH, S.; MIYAKE, TAKAGI, K., TAKEO, S. Transient ischemia enhances tyrosine phosphorylation and binding of the NMDA receptor to the Src homology 2 domain of phosphatidylinositol 3-kinase in the rat hippocampus. *J Neurochem.* v.84, p.67-76, 2003.

TANG, B.; JI, Y.; TRAUB, R.J.; Estrogen alters spinal NMDA receptor activity via a PKA signaling pathway in a visceral pain model in the rat. *Pain.* 2007.

TAUSKELA, J.S.; BRUNETTE, E.; MONETTE, R.; COMAS, T.; MORLEY, P.

Preconditioning of cortical neurons by oxygen-glucose deprivation: tolerance induction through abbreviated neurotoxic signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* v.285, p.899-911, 2003.

TAVARES, R.G.; TASCA, C.I.; SANTOS, C.E.S., ALVES, L.B.; PORCIÚNCULA, L.O.; EMANUELLI, T., SOUZA, D.O. Quinolinic Acid stimulates Synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. *Neurochemistry International.* v.40, p.621-627, 2002.

TAVARES, R.G.; SCHMIDT, A.P.; ABUD, J.; TASCA, C.I.; SOUZA, D.O. In vivo Quinolinic Acid Increases Synaptosomal Glutamate Release in Rats: Reversla by Guanosine. *Neurochemical Research.* v.30, p. 439-444, 2005.

TAVARES, R.G.; SCHMIDT, A.P.; TASCA, C.I.; SOUZA, D.O. Quinolinic Acid-induced seizures stimulate glutamate uptake into Synaptic Vesicles from Rat Brain: Effects prevented by Guanine-based purines. *Neurochemical Research.* v.33, p.97-102, 2008.

TOYODA, H.; ZHAO, M.G.; XU, H.; WU, L.J.; REN, M.; ZHUO, M. Requirement of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase for long-term potentiation in adult mouse anterior cingulate cortex. *Molecular Pain.* v.3, 2007.

VANDRESEN-FILHO, S.; DE ARAÚJO HERCULANO, B.; FRANCO, J.L.; BOECK, C.R.; DAFRÉ, A.L.; TASCA, C.I. Evaluation of glutathione metabolism in NMDA preconditioning against quinolinic acid-induced seizures in mice cerebral cortex and hippocampus. *Brain Research*. v.1184, p.38-45, 2007.

WARING, P. Redox Active calcium ion channels and cell death. *Archives Biochemistry and Biophysics*. v.434, p. 33-42, 2005.

WAXMAN, E.A.; LYNCH, D.R. N-methyl-D-aspartate Receptor Subtypes: Multiple Roles in Excitotoxicity and Neurological Disease. *Neuroscientist*. v.11, p.37-49, 2005.

YAMAUCHI, T. Molecular Mechanism of Learning and Memory based on the research for Ca^{2+} /calmodulin-dependent Protein kinase II. *Yakurigaku Zasshi*. v.127, p. 1173-1197, 2007.

YANG, Y.; WANG, X.B.; FRERKING, M.; ZHOU, Q. Delivery of AMPA receptors to perisynaptic sites precedes the full expression of long-term potentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v.105, p.11388-11393, 2008.

ANEXOS

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainres**BRAIN
RESEARCH****Research Report**

Evaluation of glutathione metabolism in NMDA preconditioning against quinolinic acid-induced seizures in mice cerebral cortex and hippocampus

Samuel Vandresen-Filho^a, Bruno de Araújo Herculano^a, Jeferson Luis Franco^b,
Carina Rodrigues Boeck^c, Alcir Luiz Dafre^b, Carla Inês Tasca^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil

^bDepartamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil

^cLaboratório de Neurociências, Programa de Pós-graduação Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000, Criciúma, SC, Brasil

ARTICLE INFO**Article history:**

Accepted 30 September 2007

Available online 11 October 2007

Keywords:

Cerebral cortex

Glutathione

Hippocampus

NMDA preconditioning

Quinolinic acid

Seizure

ABSTRACT

Brain preconditioning refers to a wide range of treatments that induce a neuronal tolerance state where neuronal tissue become more resistant to a subsequent lethal insult. The mechanisms underlying the preconditioning-induced brain tolerance are not fully understood, but up-regulation of antioxidant enzymes activity has been suggested to play an important role. In order to test this hypothesis, evaluation of glutathione (GSH) scavenger system was carried out in mice showing the neuroprotective effect of NMDA preconditioning against quinolinic acid (QA)-induced seizures. NMDA is known to prevent seizures in 53% of the animals and completely prevent neural damage against QA. Mice were preconditioned by a non-convulsant NMDA dose (75 mg/kg, 10 ml/kg i.p.) 24 h before QA infusion (4 μ l, 9.2 mM i.c.v.). GSH content and enzymatic activities of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) were evaluated in the cerebral cortex and hippocampus 24 h after QA infusion. NMDA preconditioning and QA infusion did not alter GSH content, GR and G6PDH activities, however, an increase in GST activity was observed in the cerebral cortex from mice. Moreover, NMDA pretreatment was able to prevent the QA-induced decrease in hippocampal GPx activity, but it was not effective against the decreased cortical GPx activity. These results indicate that, although NMDA preconditioning and QA toxicity modulate the activity of some GSH related enzymes, GSH metabolism is not directly linked to the neuroprotective effect induced by NMDA preconditioning.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Fax: +55 48 37211 9672.

E-mail address: tasca@ccb.ufsc.br (C.I. Tasca).

Abbreviations: G6PDH, Glucose-6-phosphate dehydrogenase; GPx, Glutathione peroxidase; GR, Glutathione reductase; GSH, Glutathione; GST, Glutathione S-transferase; NMDA, N-methyl-D-aspartate; NMDAR, N-methyl-D-aspartate receptors; QA, Quinolinic acid

1. Introduction

Brain preconditioning refers to a state of transient brain tissue tolerance to a lethal insult evoked by a prior mild insult (Dirnagl et al., 2003). Preconditioning can be evoked by a variety of physical or chemical stimuli (Rejdak et al., 2001), such as chemical preconditioning with *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) which has been shown to protect neurons in vitro and in vivo. In vitro, subtoxic concentration of NMDA prevents neuronal death induced by glutamate, NMDA (Chuang et al., 1992; Dickie et al., 1996; Boeck et al., 2005) or oxygen and glucose deprivation (Pringle et al., 1999; Valentim et al., 2003). In vivo, NMDA preconditioning can be evoked by a non-convulsant dose of NMDA, and it is known to be neuroprotective against kainate toxicity (Ogita et al., 2003) or ischemia (Miao et al., 2005). NMDA prevents seizures and neuronal death induced by quinolinic acid (QA) in mice (Boeck et al., 2004). Despite the well known neuroprotective NMDA effect, the neural mechanisms involved in NMDA preconditioning remain unknown.

It is conceivable that brain preconditioning may be due, at least in part, to the upregulation of cellular defense systems, although the effectors of this process remain unclear (Gidday, 2006). Antioxidant molecules and proteins have been suggested to act as effectors of brain preconditioning (Dirnagl et al., 2003; Gidday, 2006). The tripeptide L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine, glutathione (GSH), participates in several cellular processes such as synthesis of DNA, proteins, leukotrienes and modulation of protein function, besides exerting an important role in the cell antioxidant system as the most abundant non-protein thiol in mammal cells (Sims et al., 2004; Njalsson, 2005). GSH can react non-enzymatically with oxidative compounds or support glutathione peroxidase (GPx) activity in the clearance of hydrogen and organic peroxides. GSH also takes part in detoxification reactions, such as in the detoxification of electrophilic compounds via glutathione S-transferase (GST) (Maher, 2005). GPx-mediated peroxide detoxification leads to glutathione disulfide (GSSG) formation, which can be converted back to GSH by glutathione reductase in a NADPH-dependent reaction (Wang and Balltor, 1998). Severe oxidative stress is known to decrease total GSH (GSH-t) levels (Tan et al., 2001), while moderate stress has been shown to increase GSH-t levels, which is probably involved in the generation of cellular tolerance to posterior harmful injuries (Dickinson and Forman, 2002; Seo et al., 2004).

QA, an endogenous tryptophan metabolite, is a well known NMDA receptor (NMDAR) agonist that can cause excitotoxicity through elevation of cytosolic concentrations of free Ca^{2+} , ATP exhaustion and free radicals formation (Stone et al., 2000; Naredo et al., 2005). QA toxicity has been implicated in various pathological conditions, such as Huntington's and Parkinson's diseases (Stone, 2001), and in the dementia associated with HIV infection (Heyes et al., 1989). Besides its agonist action at NMDAR, QA can also overstimulate the glutamatergic system through modulation of glutamate transport. QA inhibits glutamate uptake in cultured astrocytes (Tavares et al., 2002) and also decrease glutamate uptake into an in vitro synaptic vesicles preparation (Tavares et al., 2000). Cerebro-ventricular administration of QA is known to induce clonic-tonic seizures

(Schmidt et al., 2000), cause neural death (Ganzella et al., 2006) and could be involved in the etiology of epilepsy in humans (Heyes et al., 1990).

As we have previously demonstrated, NMDA preconditioning can prevent seizures and neural death in the hippocampus after intracerebroventricular (i.c.v.) infusion of QA (Boeck et al., 2004). However, the effector proteins involved in the brain tolerant state are not known. In the present study, we aimed to verify if GSH and the GSH related enzymes could act as inducible effectors by NMDA preconditioning by evaluating their activity after treatment with NMDA and QA in vivo.

2. Results

As previously demonstrated by Boeck et al. (2004), NMDA administration 24 h before QA infusion provided 53.1% of protection against the incidence of seizures induced by QA. Moreover, in those animals in which NMDA preconditioning did not provide protection against seizures, NMDA treatment had no effect either on latency for seizures or duration of seizures (Table 1).

The cortical and hippocampal GSH-t levels were evaluated after NMDA preconditioning and 24 h after QA induced seizures. NMDA treatment or QA infusion did not provoke any alteration in GSH-t levels neither in cortex nor in hippocampus in comparison to the sham operated control group (saline). Additionally, GSH-t levels did not change between non-convulsed (NQnc) and convulsed (NQc) groups (Fig. 1A).

As GPx activity has been shown to be changed after hypoxic preconditioning (Arthur et al., 2004), we evaluated GPx activity after NMDA preconditioning as well as QA i.c.v. infusion. In the cerebral cortex, all mice treated with QA showed a significant reduction in the GPx activity compared with NMDA and control groups (Fig. 1B). NMDA preconditioning did not alter GPx activity and was unable to abolish the QA-induced reduction in GPx activity even in non-convulsed animals. In the hippocampus, QA-treated mice showed a significant reduction in GPx activity in comparison to the control group. NMDA preconditioning prevented the GPx activity decrease caused by QA, which can be considered as a protective effect (Fig. 1B).

Table 1 – Incidence, latency and duration of seizures after NMDA preconditioning and QA infusion

Groups	Incidence of seizures: number of convulsed mice/total number of mice	Latency for seizures onset (s)	Duration of seizures (s)
Control	0/7	–	–
NMDA	0/8	–	–
QA	14/14	19.7 ± 16.0	38.7 ± 16.0
NQnc	17/32	–	–
NQc	15/15	20.2 ± 11.0	37.7 ± 10.0

Mice were treated with vehicle (saline, Control group) or NMDA (75 mg/kg, i.p.) 24 h before QA infusion (36.8 nmol, i.c.v.) and were observed for 10 min for the occurrence of convulsions. NQnc indicates NMDA plus QA non-convulsed mice and NQc indicates NMDA plus QA convulsed mice. Data are presented as means ± S.D. (ANOVA followed by Duncan's Test).

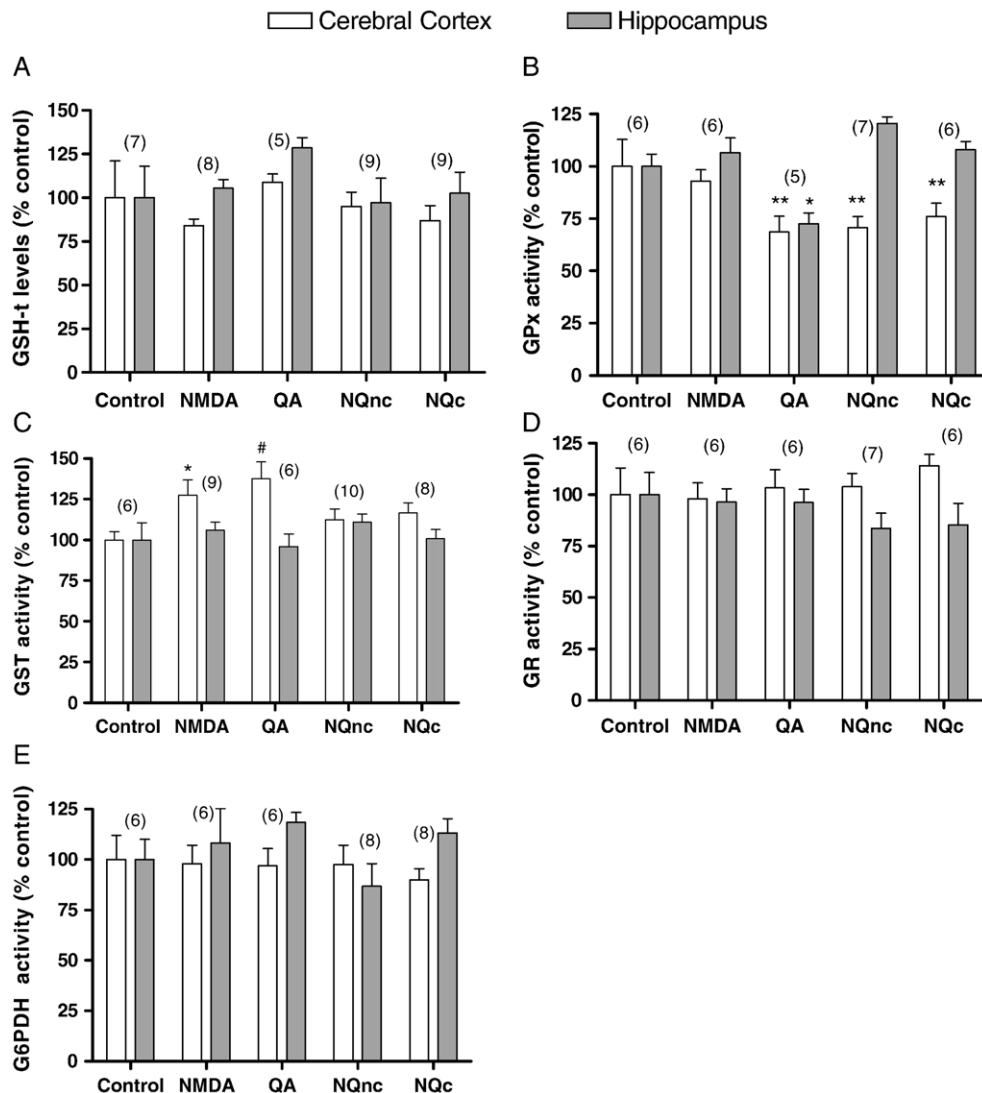


Fig. 1 – Evaluation of glutathione metabolism in cerebral cortex and hippocampus of mice following NMDA preconditioning and QA infusion. Mice were treated with vehicle (saline, Control group) or NMDA (75 mg/kg, i.p.) 24 h before QA infusion (36.8 nmol, i.c.v.) and were observed for 10 min for the occurrence of convulsions. Mice were decapitated 24 h after QA infusion and the cerebral cortex and hippocampus were used for GSH-t levels analysis and enzymatic assays. NQnc indicates NMDA plus QA non-convulsed mice, and NQc indicates NMDA plus QA convulsed mice. Values are expressed as percentage of control and represent means \pm S.E.M. (A) GSH-t levels. Control GSH-t levels are 2.28 ± 0.12 μ mol/g wet tissue for cerebral cortex and 2.05 ± 0.13 μ mol/g wet tissue for hippocampus. (B) GPx activity. Control GPx activity is 15.76 ± 0.38 nmol/min/mg protein for cerebral cortex and 8.29 ± 0.18 nmol/min/mg protein for hippocampus. (C) GST activity. Control GST activity is 76.1 ± 0.57 nmol/min/mg protein for cerebral cortex and 134.2 ± 1.12 nmol/min/mg protein for hippocampus. (D) GR activity. Control GR activity is 28.6 ± 0.6 nmol/min/mg protein for cerebral cortex and 34.4 ± 0.5 nmol/min/mg protein for hippocampus. (E) G6PDH activity. Control G6PDH activity is 13.45 ± 0.19 nmol/min/mg protein for cerebral cortex and 7.02 ± 0.22 nmol/min/mg protein for hippocampus. The number of animals for each group is indicated between parenthesis above the bars. * $p < 0.05$ compared with control group. ** $p < 0.05$ compared with control and NMDA groups. # $p < 0.05$ compared with control and NQnc groups (ANOVA followed by Duncan's test).

As QA is known to generate lipid peroxidation products (Yan et al., 2005) and GST is able to detoxify such compounds (Maher, 2005), we aimed to analyze the effects of treatments on GST activity. Interesting finding was found in the cerebral cortex, where an increased GST activity was observed in the NMDA preconditioned and in the QA group, as compared to the control group (Fig. 1C). Nevertheless, the association of NMDA preconditioning with QA prevented such an increase in

convulsed or non-convulsed mice. In hippocampus, no significant changes in GST activity were observed among groups regardless of treatment or the occurrence of seizures (Fig. 1C).

GSSG, generated by GPx activity in response to oxidative stress, is converted back to GSH by GR in a reaction dependent of NADPH, which is generated by G6PDH activity. NMDA preconditioning and/or QA infusion did not result in signi-

ficant changes in both GR (Fig. 1D) or G6DPH (Fig. 1E) activity, neither in the cerebral cortex nor in the hippocampus, in comparison to the control group.

3. Discussion

The understanding of molecular mechanisms involved in the generation of brain preconditioning is crucial to delineate new neuroprotective approaches. Many studies have shown that brain tolerance requires 24 h to be established and the synthesis of new proteins may be necessary (Marini and Paul, 1992; Emerson et al., 1999; Ravati et al., 2001; Ma et al., 2006). However, the direct role of protective proteins involved in preconditioning remains unknown. Antioxidant enzymes are potential candidates as end-effectors of brain preconditioning (Danielisova et al., 2005), as promoted by NMDA against QA-induced seizures, since they could counteract the effect of reactive oxygen species (ROS), which are known to play a role in the QA excitotoxicity (Rodríguez-Martínez et al., 2000). NMDA preconditioning reduced seizures as well as propidium iodide incorporation induced by QA into hippocampal slices (Boeck et al., 2004). QA excitotoxicity may induce an early (hours) oxidative insult (Rodríguez-Martínez et al., 2000; Ganzella et al., 2006), which was alleviated at later periods, e.g. 24 h (Ganzella et al., 2006). Parallel to this reduction in ROS production, antioxidant potential and reactivity was increased (Ganzella et al., 2006), suggesting that reduction of QA-induced redox unbalance may be associated to NMDA preconditioning. In the present study, we investigated glutathione related antioxidant defenses as potential mediators of QA-induced brain damage, as well as, their possible involvement in NMDA preconditioning.

Since GSH is the most predominant non-protein thiol in the cell, GSH-t levels and GSH/GSSG ratio are considered indicators of cellular redox state and can be considered a marker of oxidative cellular stress (Maher, 2005). In this study, to elucidate the end-effectors activated by a subtoxic dose of NMDA and QA toxicity, we carried out an analysis of the glutathione scavenger system, considering it has been widely demonstrated that depletion of cellular GSH is associated with cell death (Wullner et al., 1999; Rizzardini et al., 2003; Sims et al., 2004). In our model, NMDA preconditioning did not evoke any alteration in GSH-t levels indicating that NMDA treatment was not toxic (Fig. 1A). Our results do not support previous *in vitro* reports showing increase in the GSH levels (Singh and Kaur, 2006) after a subtoxic dose of NMDA, although we did not evaluate the GSH/GSSG ratio. QA also did not evoke any change in GSH-t levels 24 h after its *i.c.v.* infusion (Fig. 1A). Cruz-Aguado et al. (2000) have shown that the intrastriatal infusion of 225 nmol of QA induced a long-lasting (1 week) decrease in striatal GSH content, with no changes in cortical or hippocampal GSH levels. The lack of effect of QA on GSH content in cerebral cortex and hippocampus observed in our study (Fig. 1A) could be due to the lower dose used (36.8 nmol) or to the fact that ROS generated after QA *i.c.v.* infusion are increased 4 h after treatment, but return to control values at 24 h (Ganzella et al., 2006). However, a short time (hours) response to oxidative insult may induce an up-regulation of several antioxidant enzymes, which is

usually retained for 24 to 48 h (Jhoo et al., 2004; Danielisova et al., 2005; Franco et al., 2007).

Depending on the model, preconditioning may not induce up-regulation in the antioxidant defenses. Previous reports using other preconditioning stimuli such as ischemia, or cortical spreading depression did not find modulation in glutathione-related enzymes or $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ - and Mn^{2+} -superoxide dismutase (Mitchell et al., 2001; Puisieux et al., 2004). However, in other models or treatment protocols up-regulation of antioxidant defenses has been found (Arthur et al., 2004; Danielisova et al., 2005; Cui et al., 2007). Pretreatment with antioxidants, such as ebselen, a seleno-organic antioxidant, or dimethylthiourea, a free radical scavenger, are able to abolish neuroprotection, suggesting that an initial oxidative stress could trigger the ischemic preconditioning. This may be the case in NMDA preconditioning, where increased GPx and Cu^{2+} -superoxide dismutase activities have been found in C6 glioma (Singh and Kaur, 2006) and SHSY5Y neuroblastoma (Singh and Kaur, 2005) or cortical neuronal (Arthur et al., 2004) cultures. In our experiments, QA infusion was able to reduce GPx activity in cortical and hippocampal samples (Fig. 1B), indicating that the increased antioxidant response induced by QA (Ganzella et al., 2006) is not directly related to GPx activity. A single (226–240 nmol) intrastriatal QA injection has been shown to increase lipid peroxidation, whereas GPx activity remained unchanged for 2 h (Rodríguez-Martínez et al., 2000; Santamaría et al., 2003) and 6 weeks (Cruz-Aguado et al., 2000) after lesion.

Regarding the NMDA preconditioning, it did not alter GPx activity (Fig. 1B), also indicating that GPx is not involved in the neuroprotective effect of NMDA preconditioning. In cortical samples, all groups that received QA by *i.c.v.* infusion showed a decreased GPx activity and NMDA preconditioning was unable to prevent this effect (Fig. 1B). However, such prevention was observed in the hippocampus, where NMDA preconditioning abolished QA-induced GPx decreased activity, independently of the protection against QA-induced seizures promoted by NMDA preconditioning. The opposite responses observed between these cerebral structures may be related to different mechanisms of QA and NMDA interaction on GPx activity or expression in the hippocampus and cerebral cortex and need to be further investigated.

NMDA preconditioning or QA infusion induced an increase in GST activity in cerebral cortex (Fig. 1C). A previous report also showed an increase in GST in the striatum after QA treatment (Cruz-Aguado et al., 2000). In an animal model of Parkinson's disease, GST activity was increased in the striatum of lesioned animals (García et al., 1997), indicating that GST may be responsive to 6-hydroxidopamine-induced damage. It would be interesting to verify if a particular GST isoform is responsible for the observed effects. As we measured total GST activity using the broad substrate CDNB, amplification of a particular isoform may be underscored and need to be investigated. Also of interest is the inhibitory effect of monoamine metabolites on GST activity (Sawicki et al., 2001), even though we could not find any evidence that QA may be either a substrate or display any inhibitory effect on GST activity. Recently, the glutathione system have been implicated on the neuroprotective action of antipsychotic drugs in cultured neuronal cells (Cui et al., 2007), and the

participation of three GST isoforms has been highlighted (Wang et al., 2004). Despite the interaction between QA and NMDA, preventing the increase in cortical GST activity observed after each treatment alone (Fig. 1C), GST is a potential responsible for the antioxidant protection in several models of neuronal damage. In fact, GST can act to neutralize lipid peroxidation products (Maher, 2005), which are known to be generated in several models of excitotoxicity, e.g. by NMDAR overactivation (Babu and Bawari, 1997). Furthermore, the heterogeneity in the distribution of a particular isoform or a specific activity (Johnson et al., 1993; Singhal et al., 1994) underlines the need for further studies to clarify the role of GST in neuroprotection. For instance, when GST π activity/expression is reduced, nigrostriatal neurons become more vulnerable to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in a parkinsonism model (Smeyne et al., 2007), reinforcing the importance of further studies regarding the importance of GST in neuroprotection and preconditioning.

GR activity remained unchanged in cerebral cortex and hippocampus of mice exposed to NMDA preconditioning as well as those exposed to preconditioning and QA infusion (Fig. 1D). Our data differ from previous results reporting that cortical neuronal cultures exposed to hypoxic preconditioning show increased GR activity and, additionally, significant lower levels of superoxide and hydrogen peroxide (Arthur et al., 2004). We also demonstrated that QA did not exert any effect on GR activity (Fig. 1D). Cruz-Aguado et al. (2000), in the same way, did not observe changes on GR activity in the frontal cortex and hippocampus after QA intrastratial injection, even though a decrease on GR activity was observed in the injected striatum.

G6PDH activity has not been previously investigated in preconditioning models. We are hereby showing that G6PDH activity was not altered in NMDA preconditioning against QA-induced seizures (Fig. 1E).

The present study demonstrates that subtoxic NMDA treatment (NMDA preconditioning) induces protection against QA-induced seizures and the GSH scavenger system could not be directly associated to the effectors that underlie the tolerance induced by NMDA preconditioning, even though the increase in cerebral GST activity needs further investigation to discard a possible involvement in neuroprotective mechanisms. We have demonstrated that NMDA preconditioning prevents a decrease in the GPx activity induced by QA, in the hippocampus but not in the cerebral cortex. However, NMDA preconditioning does not cause alteration in the GSH-t content, and in the activity of GR and G6PDH. Moreover, the amplification in antioxidant activity after QA infusion (Ganzella et al., 2006) could not be directly related to GPx or GST alterations, which suggest that other antioxidants, such as superoxide dismutase or catalase, may be responsible. Based on these results, we cannot rule out the possibility that a mild oxidative stress could trigger signaling cascades that might be involved in the induction of brain tolerance, which was not investigated in the present study. Thus, the identification of intrinsic cell survival mechanisms remains crucial to provide new strategies of neuroprotection that seem to be overlapped among different preconditioning methods, and may represent a

putative treatment to acute and chronic brain disorders, such as ischemia and epilepsy.

4. Experimental procedures

4.1. Materials

NMDA, QA, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form (NADPH); nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized form (NADP⁺), glucose-6-phosphate, *tert*-butylhydroperoxide, magnesium chloride, oxidized (GSSG) and reduced (GSH) glutathione; 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB); glutathione reductase; bovine serum albumin; 5,5-dithio bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). The anesthetic sodium thiopental was obtained from Cristalia (Itapira, SP, Brazil).

4.2. Animals

Male adult Swiss albino mice (30–40 g) were maintained on a 12 h light/12 h dark schedule at 25 °C. Mice were housed in plastic cages with food and water *ad libitum*. All experiments were designed to minimize animal suffering and to limit the number of animals used and were approved by local Ethical Committee for Animal Research.

4.3. Surgical procedure

Animals were anesthetized with sodium thiopental (60 mg/kg; 10 ml/kg; i.p.). Stereotaxic surgery and infusion techniques were previously described in Schmidt et al. (2000). Briefly, in a stereotaxic apparatus, the skin of the skull was removed and a 27-gauge/7-mm guide cannula was placed at 1 mm posterior to bregma, 1 mm right from midline and 1 mm above the lateral brain ventricle. The guide cannula was implanted 1.5 mm ventral to the superior surface of the skull and fixed with jeweler acrylic cement. The tip of the 30-gauge infusion cannula protruded 1 mm beyond the guide cannula, aiming the lateral ventricle. Methylene blue (4 μ l) was injected through the cannula to confirm the effectiveness of the infusions where animals without contrast in the lateral brain ventricle were discarded.

4.4. NMDA preconditioning and QA infusion

NMDA was dissolved in saline solution (NaCl 0.9 g%) and adjusted to pH 7.4 with NaOH. Animals were pretreated with NMDA in a low nonconvulsant dose (75 mg/kg; 10 ml/kg; i.p.) (Boeck et al., 2004) or with an i.p. infusion of vehicle (saline 0.9%; 10 ml/kg) 48 h after the cannula implantation and 24 h before QA or saline administration. Animals were observed for 30 min immediately after NMDA administration. The chemical seizures were induced by QA infusion (4 μ l of a 9.2 mM solution; i.c.v.) (Schmidt et al., 2000). Mice were observed for 10 min for the occurrence of wild running, clonic, tonic, or tonic-clonic seizures lasting for more than 5 s. Mice not displaying seizures during these 10 min were considered protected. As previously reported by Boeck et al. (2004), NMDA preconditioning 24 h prior to QA infusion provided a 53% protection against the incidence of seizures (non-convulsed

mice, NQnc). Also, those animals in which NMDA preconditioning did not exert protection (convulsed mice, NQc) showed no alterations either in latency or duration of seizures when compared to QA group.

The cerebral cortex and hippocampus were removed 24 h after QA infusion for the biochemical analysis, since neuroprotection was achieved within 24 h to 48 h, as previously reported (Boeck et al., 2004).

4.5. Measurement of total glutathione (GSH-t)

Mice were sacrificed by decapitation, the hippocampi and cerebral cortices were rapidly dissected and homogenized in 10 volumes of 0.5 M perchloric acid followed by centrifugation at 15,000×g over 2 min. Samples were neutralized to pH 6.0–7.0 prior the assay. The total glutathione (GSH-t) content, comprising the reduced (GSH) and disulfide (GSSG) forms, was assayed using the DTNB-GR recycling assay (Tietze, 1969) as modified by Akerboom and Sies (1981).

4.6. Enzyme assays

Hippocampi and cerebral cortices were rapidly dissected and homogenized in 20 mM HEPES buffer, pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 20,000×g, for 30 min at 4 °C, and the resultant supernatant was used for the antioxidant enzyme assays. The enzyme activity was determined in the supernatant in a Varian Cary 50 spectrophotometer. The glutathione reductase (GR) activity was determined according to Carlberg and Mannervik (1985). Briefly, GR reduces GSSG to GSH at the expenses of NADPH, the disappearance of which can be followed at 340 nm. GPx activity was measured indirectly by monitoring the consumption of NADPH at 340 nm according to Wendel (1981). The GPx uses GSH to reduce the *tert*-butylhydroperoxide, producing GSSG which is readily reduced to GSH by excess GR, thus consuming NADPH. Glutathione S-transferase (GST) activity was assayed by the procedure of Habig and Jakoby (1981), using CDNB as a substrate. The assay was conducted by monitoring the appearance of the conjugated complex of CDNB and GSH at 340 nm. The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) was determined by means of the absorbance increase induced by the reduction of NADP⁺ to NADPH, at 340 nm (Glock and McLean, 1953). The protein content was measured by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard. Enzyme activity was measured as nmol/min/mg protein and expressed as percentage of the control group.

4.7. Statistical analysis

Results were analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's post hoc test. Differences were considered significant at >95% confidence.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Brazilian National Research Council (CNPq) and Fapesc to C.I. Tasca, and

International Foundation for Science (IFS) to A. L. Dafre. C. R. B. is recipient of CNPq post-doctoral fellowship. C. I. T. is recipient of CNPq productivity fellowship.

REFERENCES

- Akerboom, T.P., Sies, H., 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77, 373–382.
- Arthur, P.G., Lim, S.C., Meloni, B.P., Munns, S.E., Chan, A., Knuckey, N.W., 2004. The protective effect of hypoxic preconditioning on cortical neuronal cultures is associated with increases in the activity of several antioxidant enzymes. *Brain Res.* 1017, 146–154.
- Babu, G.N., Bawari, M., 1997. Single microinjection of L-glutamate induces oxidative stress in discrete regions of rat brain. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 43, 1207–1217.
- Boeck, C.R., Ganzella, M., Lottermann, A., Vendite, D., 2004. NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. *Epilepsia* 45, 745–750.
- Boeck, C.R., Kroth, E.H., Bronzatto, M.J., Vendite, D., 2005. Adenosine receptors co-operate with NMDA preconditioning to protect cerebellar granule cells against glutamate neurotoxicity. *Neuropharmacology* 49, 17–24.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113, 484–490.
- Chuang, D.M., Gao, X.M., Paul, S.M., 1992. N-methyl-D-aspartate exposure blocks glutamate toxicity in cultured cerebellar granule cells. *Mol. Pharmacol.* 42, 210–216.
- Cruz-Aguado, R., Francis-Turner, L., Diaz, C.M., Antunez, I., 2000. Quinolinic acid lesion induces changes in rat striatal glutathione metabolism. *Neurochem. Int.* 37, 53–60.
- Cui, J., Shao, L., Young, L.T., Wang, J.F., 2007. Role of glutathione in neuroprotective effects of mood stabilizing drugs lithium and valproate. *Neurosci.* 144, 1447–1453.
- Danielisova, V., Nemethova, M., Gottlieb, M., Burda, J., 2005. Changes of endogenous antioxidant enzymes during ischemic tolerance acquisition. *Neurochem. Res.* 30, 559–565.
- Dickie, B.G.M., Holmes, C., Greenfield, S.A., 1996. Neurotoxic and neurotrophic effects of chronic N-methyl-D-aspartate exposure upon mesencephalic dopaminergic neurons in organotypic culture. *Neuroscience* 72, 731–741.
- Dickinson, D.A., Forman, H.J., 2002. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 973, 488–504.
- Dirmagl, U., Simon, R.P., Hallenbeck, J.M., 2003. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci.* 26, 248–254.
- Emerson, M.R., Nelson, S.R., Samson, F.E., Pazdernik, T.L., 1999. Hypoxic preconditioning attenuates brain edema associated with kainic acid-induced status epilepticus in rats. *Brain Res.* 825, 189–193.
- Franco, J.L., Prediger, R.D.S., Pandolfo, P., Takahashi, R., Farina, M., Dafre, A.L., 2007. Antioxidant responses and lipid peroxidation following intranasal 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine administration in rats: Increased susceptibility of olfactory bulb. *Life Sci.* 80, 1906–1914.
- Ganzella, M., Jardim, F.M., Boeck, C.R., Vendite, D., 2006. Time course of oxidative events in the hippocampus following intracerebroventricular infusion of quinolinic acid in mice. *Neurosci. Res.* 55, 397–402.

- Garcia, J.C., Cruz, R., Leiva, A., Alvarez, P., Soto, Y., McPherson, M., 1997. Lesion of nigrostriatal neurons by 6-hydroxydopamine induces changes in rat brain glutathione-S-transferase. *Mol. Chem. Neuropathol.* 31, 149–159.
- Gidday, J.M., 2006. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat. Rev., Neurosci.* 7, 437–448.
- Glock, G.E., McLean, P., 1953. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem. J.* 55, 400–408.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.* 77, 218–231.
- Heyes, M.P., Rubinow, D., Lane, C., Markey, S.P., 1989. Cerebrospinal fluid quinolinic acid concentrations are increased in acquired immune deficiency syndrome. *Ann. Neurol.* 26, 275–277.
- Heyes, M.P., Wyler, A.R., Devinsky, O., Yergey, J.A., Markey, S.P., Nadi, N.S., 1990. Quinolinic acid concentrations in brain and cerebrospinal fluid of patients with intractable complex partial seizures. *Epilepsia* 31, 172–177.
- Jhoo, J.H., Kim, H.C., Nabeshima, T., Yamada, K., Shin, E.J., Jhoo, W.K., Kim, W., Kang, K.S., Jo, S.A., Woo, J.I., 2004. Beta-amyloid (1–42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex. *Behav. Brain Res.* 155, 185–196.
- Johnson, J.A., Barbary, E.L., Kornuth, A., Brugge, S.E., Siegel, J.F., 1993. Glutathione S-transferase isoenzymes in rat brain neurons and glia. *J. Neurosci.* 13, 2013–2023.
- Ma, D., Hossain, M., Pettet, G.K., Luo, Y., Lim, T., Akimov, S., Sanders, R.D., Franks, N.P., Maze, M., 2006. Xenon preconditioning reduces brain damage from neonatal asphyxia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 26, 199–208.
- Maher, P., 2005. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res. Rev.* 4, 288–314.
- Marini, A.M., Paul, S.M., 1992. N-methyl-D-aspartate receptor mediated neuroprotection in cerebellar granule cells requires new RNA and protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6555–6559.
- Miao, B., Yin, X.H., Pei, D.S., Zhang, Q.G., Zhang, G.Y., 2005. Neuroprotective effects of preconditioning ischemia on ischemic brain injury through down-regulating activation of JNK1/2 via N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Akt1 activation. *J. Biol. Chem.* 280, 21693–21699.
- Mitchell, K., Kariko, K., Harris, V.A., Rangel, Y., Keller, J.M., Welsh, F.A., 2001. Preconditioning with cortical spreading depression does not upregulate Cu/Zn-SOD or Mn-SOD in the cerebral cortex of rats. *Brain Res.* 96, 50–58.
- Naredo, I.V., Poeggeler, B., Sanches, V.S., Caballero, B., Zapico, C.T., Garcia, O.A., Tolivia, D., Colunga, M.R., Montes, A.C., 2005. Melatonin neutralizes neurotoxicity induced by quinolinic acid in brain tissue culture. *J. Pineal Res.* 39, 266–275.
- Njalsson, R., 2005. Glutathione synthetase deficiency. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 1938–1945.
- Ogita, K., Okuda, H., Yamamoto, Y., Nishiyama, N., Yoneda, Y., 2003. In vivo neuroprotective role of NMDA receptors against kainate-induced excitotoxicity in murine hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurochem.* 85, 1336–1346.
- Pringle, A.K., Thomas, S.J., Signorelli, F., Iannotti, F., 1999. Ischaemic pre-conditioning in organotypic hippocampal slice cultures is inversely correlated to the induction of the 72 kDa heat shock protein (HSP72). *Brain Res.* 845, 152–164.
- Puisieux, F., Deplanque, D., Bulckaen, H., Maboudou, P., Gelé, P., Lhermitte, M., Lebuffe, G., Bordet, R., 2004. Brain ischemic preconditioning is abolished by antioxidant drugs but does not up-regulate superoxide dismutase and glutathione peroxidase. *Brain Res.* 1027, 30–37.
- Ravati, A., Ahlemeyer, B., Becker, A., Klumpp, S., Kriegstein, J., 2001. Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species and activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *J. Neurochem.* 78, 909–919.
- Rejdak, R., Rejdak, K., Sieklucka-Dziub, M., Stelmasiak, Z., Grieb, P., 2001. Brain tolerance and preconditioning. *Pol. J. Pharmacol.* 53, 73–79.
- Rizzardini, M., Lupi, M., Bernasconi, S., Mangolini, A., Cantoni, L., 2003. Mitochondrial dysfunction and death in motor neurons exposed to the glutathione-depleting agent ethacrynic acid. *J. Neurol. Sci.* 207, 51–58.
- Rodríguez-Martínez, E., Camacho, A., Maldonado, P.D., Pedraza-Chaverrí, J., Santamaría, D., Galvan-Arzate, S., Santamaría, A., 2000. Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Res.* 858, 436–439.
- Santamaría, A., Salvatierra-Sánchez, R., Vázquez-Roman, B., Santiago-Lopez, D., Villeda-Hernández, J., Galvan-Arzate, S., Jimenez-Capdeville, M.E., Ali, S.F., 2003. Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies. *J. Neurochem.* 86, 479–488.
- Sawicki, J., Kuzma, M., Baranczyk-Kuzma, A., 2001. The effect of serotonin, its precursors and metabolites on brain glutathione-S-transferase. *Neurochem. Res.* 26, 469–472.
- Schmidt, A.P., Lara, D.R., Marahin, J.F., Perla, A.S., Souza, D.O., 2000. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res.* 864, 40–43.
- Seo, Y.J., Lee, J.W., Lee, E.H., Lee, H.K., Kim, H.W., Kim, Y.H., 2004. Role of glutathione in the adaptive tolerance to H₂O₂. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1272–1281.
- Sims, N.R., Nilsson, M., Muyderman, H., 2004. Mitochondrial glutathione: a modulator of brain cell death. *J. Bioenerg. Biomembranes* 36, 329–333.
- Singh, J., Kaur, G., 2005. Neuroprotection mediated by subtoxic dose of NMDA in SH-SY5Y neuroblastoma cultures: activity-dependent regulation of PSA-NCAM expression. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 137, 223–234.
- Singh, J., Kaur, G., 2006. HSP70 induction and oxidative stress protection mediated by a subtoxic dose of NMDA in the retinoic acid-differentiated C6 glioma cell line. *Brain Res. Bull.* 69, 37–47.
- Singhal, S.S., Zimniak, P., Awasthi, S., Piper, J.T., He, N.G., Teng, J.I., Petersen, D.R., Awasthi, Y.C., 1994. Several closely related glutathione S-transferase isozymes catalyzing conjugation of 4-hydroxynonenal are differentially expressed in human tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 311, 242–250.
- Smeyne, M., Boyd, J., Raviie Shepherd, K., Jiao, Y., Pond, B.B., Hatler, M., Wolf, R., Henderson, C., Smeyne, R.J., 2007. GST π expression mediates dopaminergic neuron sensitivity in experimental parkinsonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1777–1782.
- Stone, T.W., 2001. Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Prog. Neurobiol.* 64, 185–218.
- Stone, T.W., Behan, W.M., MacDonald, M., Darlington, L.G., 2000. Possible mediation of quinolinic acid-induced hippocampal damage by reactive oxygen species. *Amino Acids* 19, 275–281.
- Tan, S., Schubert, D., Maher, P., 2001. Oxytosis: a novel form of programmed cell death. *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 497–506.
- Tavares, R.G., Tasca, C.I., Santos, C., Souza, M., Dutra-Filho, D.O., 2000. Quinolinic acid inhibits glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain. *NeuroReport* 11, 249–253.
- Tavares, R.G., Santos, C.I., Alves, C.E., Porciuncula, L.B., Emanuelli, L.O., Souza, T., 2002. Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. *Neurochem. Int.* 40, 621–627.
- Tietze, F., 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27, 502–522.
- Valentim, L.M., Rodnight, R., Geyer, A.B., Horn, A.P., Tavares, A., Cimarosti, H., Netto, C.A., Salbego, C.G., 2003. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunocontent in

- response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience* 118, 379–386.
- Wang, W., Balltari, N., 1998. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol. Rev.* 50, 332–355.
- Wang, J.F., Shao, L., Sun, X., Young, L.T., 2004. Glutathione S-transferase is a novel target for mood stabilizing drugs in primary cultured neurons. *J. Neurochem.* 88, 1477–1484.
- Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 77, 325–333.
- Wullner, U., Seyfried, J., Groscurth, P., Beinroth, S., Winter, S., Gleichmann, M., Heneka, M., Loschmann, P., Schulz, J.B., Weller, M., Klockgether, T., 1999. Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function. *Brain Res.* 826, 53–62.
- Yan, E., Castillo-Melendez, M., Smythe, G., Walker, D., 2005. Quinolinic acid promotes albumin deposition in Purkinje cell, astrocytic activation and lipid peroxidation in fetal brain. *J. Pineal Res.* 39, 266–275.

Resumo submetido para apresentação na forma de pôster na XXI Reunião Anual da FESBE, em 2006:

MECHANISMS INVOLVED ON NMDA PRECONDITIONING AND NEUROTOXICITY INDUCED BY QUINOLINIC ACID IN MICE.

¹Vandresen-Filho, S**, ³Boeck, C.R, ¹Herculano, B.A*, ²Ganzella, M**, ¹Franco, J.L**, ²Vendite, D, ¹Dafre, A.L., ¹Tasca, C.I.

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, SC.

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS.

³Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, SC.

Purpose: This study aimed to evaluate the levels of glutathione and the DNA fragmentation in the cortex and hippocampus of mice treated with a nonconvulsant dose of NMDA before seizures induced by quinolinic acid (QA). Moreover we aimed to delineate a time course of cellular damage in the hippocampus following seizures induced by QA.

Methods and Results: Male adult Swiss albino mice (30-40g) were submitted to stereotaxic surgery for the implantation of a guide cannula in the lateral ventricle. Mice were pretreated with a nonconvulsant dose of NMDA (75mg/Kg, i.p.) 24h before i.c.v. QA (4µL, 9.2mM) infusion, and observed for the occurrence of seizures. Cortical and hippocampal samples from treated mice were assayed to determine the glutathione levels 24h after QA infusion. No differences were observed among controls, NMDA and QA treated groups neither in the cortex nor in the hippocampus. The cortical samples from mice were assayed to DNA fragmentation 24 or 48h after QA infusion or NMDA preconditioning plus QA. No DNA laddering was observed. In order to investigate a time-dependent cellular damage in the hippocampus following QA-induced seizures, propidium iodide (PI) uptake assays were performed in hippocampal slices at 10 min, 1, 4, 8, 24, or 72 hours after i.c.v. saline or QA infusion. The quantification of PI fluorescence showed that a significant cellular damage (66±12% above control) occurred 4h after QA injection and was maintained up to 72 hours.

Conclusions: The lack of DNA laddering and the increased PI uptake observed in this study suggest that the neural damage induced by QA results in a necrotic cell death occurring just after seizures. Regarding glutathione levels, our results suggest that the main cerebral non-proteic antioxidant defense may not play a crucial role in the neuroprotection induced by NMDA preconditioning in mice.

Financial Support: CNPq, PROCAD/CAPES, FAPESC

Resumo submetido para apresentação na forma de pôster no Congresso IBRO/LARC de Neurociências da América Latina, Caribe e Península Ibérica (NEUROLATAM), em 2008:

MECANISMOS ENVOLVIDOS NO PRÉ-CONDICIONAMENTO COM NMDA E A NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR ÁCIDO QUINOLÍNICO NO HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS Vandresen-Filho, S.¹; Herculano, B.

A.²; Boeck, C. R.³; Franco, J. L.⁴; Bahl, M.M.⁵; Dafre, A. L.⁴; Tasca, C.I.⁶ -

¹Universidade Federal de Santa Catarina - Bioquímica; ²UFSC - Bioquímica; ³UNESC - NeuroLab, PPGCS; ⁴UFSC - Ciências Fisiológicas; ⁵Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC - Departamento de Ciências Fisiológicas; ⁶Universidade Federal de Santa Catarina - Bioquímica

Objetivo: Este estudo teve como objetivo avaliar os níveis de glutathione total (GSH-t) e a expressão da caspase-3 no córtex e hipocampo de camundongos tratados com uma dose sub-convulsivante de NMDA antes de convulsões induzidas por AQ.

Métodos: Camundongos adultos Swiss machos foram submetidos à cirurgia esterotáxica para a implantação de uma cânula guia no ventrículo lateral, tratados com uma dose sub-convulsivante de NMDA 24h antes da infusão de AQ (4µL, 9.2mM, i.c.v.) e observada a ocorrência de convulsões por 10 minutos. Córtex e hipocampus dos camundongos foram dissecados 24h após a infusão de QA, para a avaliação de GSH-t e para a extração de amostras para separação de proteínas por eletroforese e identificação da caspase-3.

Resultados: O pré-condicionamento com NMDA e a infusão de AQ não alteraram o conteúdo de glutathione total (GSH-t), e a atividade das enzimas glutathione redutase e da glicose 6-fosfato desidrogenase. Contudo, um aumento ($37,5 \pm 10,2$) na atividade da glutathione S-transferase (GST) foi observado no córtex cerebral após o tratamento com NMDA e AQ. Além disso, o pré-condicionamento com NMDA preveniu a diminuição na atividade da glutathione peroxidase (GPx) induzida pelo AQ no hipocampo ($27,45 \pm 5,2$), mas não teve efeito sobre a diminuição da atividade da GPx cortical ($31,4 \pm 7,6$). Os resultados estão expressos em porcentagem do controle. A expressão da caspase-3 não foi alterada pelo pré-condicionamento com NMDA e nem pelo insulto com AQ.

Conclusões: Os resultados indicaram que, apesar do pré-condicionamento com NMDA e a toxicidade do AQ modularem algumas enzimas relacionadas a GSH, o metabolismo da GSH não parece estar diretamente associado aos efeitos neuroprotetores do pré-condicionamento com NMDA. A partir dos resultados sugere-se que a via efetora de apoptose não está relacionada ao pré-condicionamento e à morte celular induzida pelo AQ.